



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES EPIGENÉTICOS
CON SIGNIFICADO CLÍNICO ASOCIADO A LA
RESPUESTA A DERIVADOS DE PLATINO EN CÁNCER
DE OVARIO**

Tesis Doctoral

Javier Andrés Soto

Madrid

2017

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid



Identificación de marcadores epigenéticos con significado clínico
asociado a la respuesta a derivados de platino en cáncer de ovario

Memoria que presenta

Javier Andrés Soto

Licenciado en Bacteriología y Laboratorio Clínico, para optar al
grado de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid

Director de la tesis:

Dra. Inmaculada Ibáñez de Cáceres

Investigador Científico

Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital de la Paz

“Si Dios está conmigo quien contra mí”

***A mi gran familia, a mi familia pequeña Laura y
Mariana, y a mi familia española.***

AGRADECIMIENTOS

Es difícil agradecer cuando se es bendecido con tanto amor y apoyo de tantas persona en tantas situaciones. El primer agradecimiento es hacia Dios por la familia que me ha dado, por todas mis “madres” que a lo largo de mi vida me ha apoyado en uno u otro sentido para llegar hasta aquí. A mi madre, a mi abuela, mi abuelo y a todas mis tías las llevo siempre conmigo, y todos los días desde que he empezado a formarme como profesional y desde la distancia les doy las gracias por todo lo que me han dado y deseo con todo mi corazón estar siempre a su lado cuando me necesiten. En segundo lugar doy nuevamente gracias a Dios por otra familia con la que se me ha colmado de felicidad y apoyo. Gracias a mi esposa por el día que escuchó mi consejo y decidió venir a probar suerte en este país. A partir de ese momento y gracias a su esfuerzo se empezó a labrar lo que hoy día toca a su fin. Gracias por esperarme, por soportar, por luchar contra tu soledad, gracias por hacer de nuestra hija la maravilla de niña que es. Espero que la vida me conceda la oportunidad de recuperar todo el tiempo que hemos estado separados físicamente y que juntos afrontemos esta nueva etapa que se avecina. Intuyo que pasará un buen tiempo para cuando puedas comprender a plenitud el sentido de estas palabras mi ángel. Son incontables los días en que mi corazón se arrugaba por no tenerte a mi lado hija. Cada vez

que pensaba en que me perdía detalles de tu niñez, de tu alegría, de tu chispa y pensaba en tu sonrisa me derrumbaba. Aunque con el tiempo me fui haciendo fuerte no ha dejado de crecer la ilusión de tenerte nuevamente entre mis brazos y volver a ser padre. Creo que ser tu padre es el mejor oficio que tengo y no necesito ser PhD para hacerlo bien. Cuando leas estas palabras quiero que sepas lo importante que has sido para que yo pudiera llegar hasta aquí, y también quiero agradecerte desde lo más profundo de mi corazón el que hayas soportado mi ausencia y los momentos de tristeza que hayas tenido en tu corazón por no tenerme a tu lado.

Quiero agradecer de manera muy especial a Inmaculada. Inma eres ejemplo a seguir como profesional, mujer, madre y persona. No creo que haya tenido suerte de caer en tus manos, pues dicen que la suerte no existe y que cada cual obtiene lo que se merece. Pues en realidad creo que a lo largo de mi vida no he ganado muchos méritos como para haber recibido tantas cosas buenas. El haber trabajado contigo y aprendido de ti es una de ellas. A parte de la formación que he recibido de ti me quedo con tus ejemplos de servicio y entrega. Por ese espíritu de ayuda y deseo constante de hacer la vida de los demás un poco mejor. Que valiente eres al tener siempre una sonrisa todos los días en tu trabajo y una palabra de aliento a pesar de tus circunstancias personales. Gracias Inma por todo lo que he recibido de ti. Soy nuevamente bendecido.

Deseo dar las gracias a mis compañeros y amigos que han estado conmigo estos 4 años de travesía en el INGEMM y a todas las persona que de una u otra manera hicieron mi estancia más alegre. Charles gracias por tu inestimable apoyo en el desarrollo de mi trabajo, gracias por tu constante disposición para despejar mis inquietudes siempre con una sonrisa y un taco a la vez. Creo que te enseñe toda la jerga colombiana que pude pero si te quedaste con ganas de más te espero por Bucaramanga. Gracias chicas por vuestra amistad y apoyo. Gracias Olga por toda la ayuda que recibí durante estos 4 años pues de ti también aprendí mucho. Gracias a todas las personas del Instituto de Genética que con su sonrisa o simplemente un buenos días como estas me hacían sentir bien.

Deseo agradecer a mi compadre que también me ha acompañado desde la distancia y sabe lo que significa estar lejos de la tierra. Gracias a mi colega colombo-germano el futuro Dr Puentes. Gracias hermano por las visitas, las cervezas, las risas, los debates, por estar pendiente de mí y de mi familia, te deseo todo lo mejor del mundo y nos vemos en Colombia amigo.

"Gracias a la vida que me ha dado tanto"

RESÚMEN.

El cáncer de ovario es la principal causa de muerte por enfermedades malignas ginecológicas. El tratamiento estándar del cáncer de ovario avanzado consiste de cirugía citoreductora, seguida de un tratamiento de quimioterapia en primera línea con derivados del platino. Sin embargo, la tasa de recaída a los 4 años es del 70%, debido al desarrollo de resistencia al tratamiento con quimioterapia. Este trabajo propone como objetivo principal la identificación de nuevos biomarcadores con potencial implicación en la respuesta a terapia. En primer lugar, el auge de las técnicas de secuenciación masiva que permiten la transición del estudio de la metilación de pequeñas regiones a estudios de epigenoma completo; y en segundo lugar, el conocimiento ya adquirido sobre los procesos de metilación génica en cáncer, nos ha permitido abordar un estudio más completo sobre el metiloma en cáncer de ovario y respuesta a tratamiento. Atendiendo a esta situación, presentamos un trabajo basado en la caracterización epigenética como mecanismo de regulación génica a partir de un modelo generado en células tumorales resistentes a platino. Otro reto planteado en este trabajo es el desarrollo de una matriz bioinformática predictiva de respuesta a platino generada gracias a los datos ómicos obtenidos “in vitro”, “in silico” y a partir de pacientes del Sistema Sanitario. El desarrollo de este trabajo ha permitido optimizar los parámetros bioinformáticos necesarios para la identificación de posibles genes supresores tumorales bajo regulación epigenética a través de la metilación de islas reguladoras, proporcionando la identificación de posiciones CpGs metiladas diferencialmente tras el tratamiento con cisplatino en regiones genómicas concretas de dos genes candidatos, *PAX9* y *FKBP1B*. Su posterior validación traslacional realizada en 47 muestras quirúrgicas y 1.200 pacientes procedentes de bases de datos de dominio público, muestran una relación estadísticamente significativa entre la presencia de metilación y la inhibición de la expresión del gen *PAX9* sobre la supervivencia global y el tiempo libre de progresión respectivamente. La simulación del funcionamiento “in silico” de la matriz predictiva generada en este trabajo ha permitido la identificación de una firma epigenética común entre nuestro modelo experimental y los datos obtenidos del análisis de muestras quirúrgicas, en la que la validación de uno de los candidatos identificados, *MEST*, evidencia la importancia del estudio transcrito-específico para cada gen candidato bajo potencial regulación epigenética, lo que favorecería la identificación de nuevos marcadores capaces de predecir la evolución y posible respuesta terapéutica en cada paciente.

ABSTRACT.

Ovarian cancer is the leading cause of death among gynaecological malignancies. Standard treatment of advanced ovarian cancer is based on cytoreductive surgery, followed by first-line chemotherapy treatment with platinum derivatives. However, the relapse rate at 4 years is 70% due to the development of resistance to treatment. The main objective of this work is to identify new biomarkers with potential role in response to therapy. First, the heyday of massive sequencing techniques that allow the transition from small regions methylation studies to whole epigenome; and secondly, knowledge already acquired about gene methylation processes in cancer, has allowed us to address a complete methyloma study in ovarian cancer and treatment response. Given this situation, we present a work based on the epigenetic characterization as a mechanism of gene regulation from a model generated in platin resistant tumour cells. Another proposed challenge is the development of a predictive bioinformatic matrix generated by the *in vitro* and *in silico* data obtained from patients belonging to the Health Care System. The development of this work allowed to optimize the bioinformatics parameters necessary for the identification of possible tumour suppressor genes under epigenetic regulation through island methylation, providing the identification of differentially methylated CpGs positions in specific genomic regions of two candidate genes, *PAX9* and *FKBP1B*, following cisplatin treatment. Their subsequent translational validation performed on 47 surgical samples and 1,200 patients from public domain databases showed a statistically significant relationship between the presence of methylation and the inhibition of *PAX9* gene expression related with overall survival and progression free survival respectively. The simulation of the "*in silico*" operation on the predictive matrix generated in this work, has allowed the identification of a common epigenetic signature among our experimental model and data obtained from surgical specimen analysis, in which validation of a single candidate, *MEST*, evidences the importance of the transcript-specific study for each gene under potential epigenetic regulation, which would favors the identification of new markers capable of predicting the evolution and possible therapeutic response in each patient.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	23
INTRODUCCIÓN	27
1. Epigenética	29
2. Cáncer	31
2.1. Cáncer de Ovario	31
2.1.1. Clasificación del CEO	32
2.1.2. Rutas implicadas en el CEO	34
2.2. Metilación del ADN en el Cáncer	35
2.2.1. Metilación del ADN en Cáncer de Ovario	36
2.3. Tratamiento del CEO	39
2.3.1. Resistencia al tratamiento con platinos	40
2.3.2. Mecanismos epigenéticos que median la resistencia a platinos en el CEO	41
3. Técnicas de abordaje masivo para el estudio de la metilación de ADN	43
3.1. Técnicas masivas de expresión génica	43
3.2. Técnicas masivas en la metilación del ADN	44
3.2.1. Metodologías basadas en la modificación del ADN por bisulfito	44
3.2.2. Metodologías sin conversión del ADN	46
3.3. Análisis integrado del Cáncer	47
OBJETIVOS	49
MATERIALES Y MÉTODOS	53
1. Líneas celulares y compuestos	55
1.1. Establecimiento de fenotipos celulares resistentes a derivados del platino	55
1.2. Tratamiento epigenético de líneas celulares	57
2. Muestras clínicas y recogida de datos	58
3. Ensayos de expresión génica	58
3.1. Microarrays de expresión génica	58
3.2. PCR a tiempo real	59
3.3. RNA-seq	61
4. Determinación de la metilación del ADN	62
4.1. Extracción del ADN	62
4.2. Modificación del ADN por bisulfito de sodio	63
4.3. Secuenciación masiva del ADN modificado por bisulfito (WGBS)	64

4.4. Array de metilación 450K de Illumina.	64
4.5. Secuenciación por bisulfito (SB).	65
4.6. PCR de metilación específica (MSP) y PCR de cuantificación de la metilación (qMSP).	67
5. Herramientas bioinformáticas usadas para la validación epigenética.	69
6. Ensayos funcionales en líneas celulares.	70
6.1. Transformación plasmídica de bacterias.	70
6.2. Transfección celular.	71
7. Análisis bioinformáticos.	72
7.1. Diseño metodológico para la identificación de biomarcadores epigenéticos, establecimiento de matrices predictivas y análisis bioinformáticos.	72
7.2. Selección de pacientes candidatos a partir de la base de datos del TCGA.	74
RESULTADOS	77
1. Establecimiento de líneas tumorales humanas de cáncer de ovario resistentes a sales de platino.	79
2. Expresión génica diferencial entre los fenotipos tumorales como efecto del tratamiento con platino.	81
3. Características técnicas de la secuenciación del metiloma en líneas tumorales de ovario sensibles y resistentes a cisplatino.	82
4. Búsqueda de biomarcadores epigenéticos en resistencia a sales de platino: Objetivo 1.	84
4.1. Análisis del metiloma.	85
4.2. Identificación de candidatos diferencialmente metilados como controles para la validación de los parámetros bioinformáticos.	85
4.3. Criterios para la selección de pacientes de la base de datos TCGA que participan en el estudio de la búsqueda de biomarcadores epigenéticos en resistencia.	88
4.4. Combinación de datos experimentales con los datos de dominio público como estrategia de selección génica para la identificación de biomarcadores epigenéticos implicados en la aparición de resistencia.	88
4.5. Validación de la presencia de metilación en los candidatos seleccionados.	89
4.6. Validación transcripcional de los genes <i>PAX9</i> y <i>FKBP1B</i> en las líneas celulares humanas de cáncer de ovario.	95
4.7. Validación funcional de la implicación de los genes <i>PAX9</i> y <i>FKBP1B</i> en la viabilidad celular al agente cisplatino.	96
4.8. Validación traslacional de los genes candidatos <i>PAX9</i> y <i>FKBP1B</i>	98
4.8.1. Análisis de la metilación de <i>PAX9</i> y <i>FKBP1B</i> en las cohortes de pacientes.	98
4.8.2. Análisis de la expresión de los genes <i>PAX9</i> y <i>FKBP1B</i> en muestras quirúrgicas.	100

4.8.3. Análisis estadísticos relacionados con los cambios en la expresión y grado de metilación de <i>PAX9</i> y <i>FKBP1B</i>	101
5. Establecimiento de las bases para el desarrollo de una matriz diagnóstica, predictiva de respuesta a Platino: Objetivo 2.	107
5.1. Análisis del metiloma.....	107
5.2. Criterios para la selección de pacientes del TCGA.....	108
5.3. Análisis masivo del transcriptoma y metiloma en muestras congeladas de pacientes con carcinoma de ovario del H.U La Paz.....	108
5.4. Diseño experimental asociado al desarrollo del objetivo 2.....	111
6. <i>MEST</i> como posible biomarcador en resistencia al tratamiento con platinos en CEO.....	115
DISCUSIÓN	121
CONCLUSIONES	139
BIBLIOGRAFÍA	143
ANEXO 1	155
PUBLICACIONES QUE HACEN PARTE DE LA TESIS	
PUBLICACIONES QUE NO HACEN PARTE DE LA TESIS	

ABREVIATURAS

APC: Adenomatous Polyposis Coli.

ARID1A: AT-Rich Interaction Domain 1A.

ATCC: American Type Culture Collection.

BRCA: Breast Cancer Early Onset.

CDBCA: carbo-platino.

CDDP: cis-platino.

CEO: Carcinoma Epitelial de Ovario.

CTNNB1: Catenin Beta-1.

DAPK: Death Associated Protein Kinase 1.

DNMT: DNA Methyl Transferases.

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético.

ERBB2: Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2.

FBS: Fetal Bovine Serum

FDA: Food and Drugs Administration.

FDR: *False Discovery Rate* (tasa de falsos positivos)

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GST: Gen Supresor de Tumor.

HDAC: Histonas desacetilasas.

HGSOC: Hlgh-Grade Serous Ovarian Cancer.

HOXA9: Homeobox A9.

ICF: Immunodeficiency, Centromere instability and Facial.

KRAS: Kirsten Rat Sarcoma.

LMP: Low Malignant Potential.

LPA: Acido lipofosfatidico

MeDIP-seq: Methylation-depent Immunoprecipitation sequencing.

MGMT: O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase.

MLH1: MutL Homolog 1.

MSP: Methylation Specific PCR.

NGS: Next Generation Sequencing.

OCT: Optimal cutting temperature

OPCML: Opioid Binding Protein/Cell Adhesion Molecule Like.

PARP: poly adenosine diphosphate-ribose polymerase.

PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells.

PBS: Phosphate-buffered saline.

PCA: Principal Component Analysis.

PCR: Polimerase Chain Reaction.

PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha.

PK: Proteínasa K.

PTEN: Phosphatase And Tensin Homolog.

qMSP: quantitive Methylation Specific PCR.

qPCR: Quantitative Polimerase Chain Reaction.

RASSF1A: Ras Association Domain Family Member 1.

RGS: Regulators of G Protein Signaling.

ROS: Reactive species of oxygen.

rpm: Revoluciones por minuto.

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium.

RQ: *Relative Quantity* (cantidad relativa, “cambio en veces de expresión génica”).

RRBS: Reduced Representation Bisulfite Sequencing.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

SFB: Suero Fetal Bovino

SGBD: sistema gestor de base de datos.

STR: short tandem repeat.

TCGA: The Genome Cancer Atlas.

TET: Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase.

THBS1: Thrombospondin 1.

TNM: Tumor-Nódulo-Metástasis.

TP53: Tumor Protein P53.

TSA: Triscotatina A.

TSS: Transcriptional Start Site.

UTR's: (Untranslated Region.

VSN: Variance Stabilization Normalization.

WGBS: Whole Genome Bisulfite Sequencing.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Epigenética.

“La Epigenética es el constante deseo de cambiar tu futuro escrito”

El genoma humano se asemeja a un libro compuesto por millones de letras que necesitan reglas gramaticales para conformar frases con sentido. Teniendo cada célula de nuestro organismo el mismo número de genes en condiciones normales, la posibilidad de que una célula se diferencie hacia un tipo específico depende de la expresión concreta de ciertos genes, expresión que está supeditada en gran medida a mecanismos epigenéticos, así como a la acción de otros elementos como factores de transcripción, activadores o represores de la transcripción y moléculas de ARN. Estas instrucciones pueden heredarse y no se encuentran codificadas en el ADN, sino específicamente en un conjunto de sucesos bioquímicos que gobiernan su transcripción, conocido como epigenoma.

1.1. Mecanismos epigenéticos.

Los mecanismos epigenéticos controlan la expresión génica sin implicar cambios en la secuencia del genoma y son principalmente la metilación del ADN, las modificaciones bioquímicas en los residuos de lisina y arginina de histonas y el papel regulador que ejercen los ARN no codificantes, tales como los microARNs. El genoma humano contiene alrededor de 28 millones de dinucleótidos CpG (Stirzaker et al., 2014), de los cuales el 80% están metilados. Estos dinucleótidos se distribuyen de manera asimétrica en el genoma, generando regiones conocidas como islas CpG. Estas pueden situarse en regiones intragénicas e intergénicas y como ejemplo de estas últimas se encuentran las regiones promotoras, en donde la metilación actúa regulando la expresión génica.

Las modificaciones en las histonas se basan en las marcas post-traduccionales ubicadas en las regiones amino terminales de sus colas. Entre ellas están la fosforilación, la sumoilación, la ubiquitinación, la acetilación y la metilación, siendo estas dos últimas las mejores caracterizadas. La acetilación está asociada a la activación de la expresión génica, pues favorece la disminución de la carga positiva de las histonas llevando a la cromatina a un estado abierto, mientras que la metilación no altera la carga pero influye en la transcripción de forma positiva o negativa, dependiendo de los residuos que sean metilados o acetilados globalmente.

Los microARN (miARN) son moléculas ARN de unos 22 nucleótidos de longitud que pueden tener un papel fundamental en el control de la expresión génica gracias a

INTRODUCCIÓN

la unión a ARN mensajero diana (ARNm). Cuando la complementariedad es total, el miARN conlleva a la degradación del ARNm, mientras que cuando ésta es incompleta se produce la inhibición de la traducción a través de un mecanismo que aún no está completamente dilucidado (Piletic and Kunej, 2016).

1.2. Metilación del ADN.

En 1975, Riggs, Holliday y Pugh propusieron la metilación del ADN como un factor primario en la regulación génica y la proliferación celular (Holliday and Pugh, 1975, Riggs, 1975) y después de 40 años permanece como el evento epigenético mejor conocido en el ser humano y el más frecuente en cáncer. La metilación del ADN es la única modificación del ADN genéticamente programada en los mamíferos y ocurre en el carbono 5 del anillo de pirimidina de las citosinas de forma casi exclusiva en el contexto de dinucleótidos CpG (Moore et al., 2013), ya que se ha observado metilación de citosinas en el contexto no CpG en células embrionarias (Lister et al., 2009). Existen tres enzimas principales involucradas en el establecimiento y el mantenimiento de los patrones de metilación del ADN: DNMT (DNA Methyl Transferases) 3A y 3B, que son metiltransferasas *de novo*; y DNMT1, que asegura el mantenimiento de la metilación a través de las divisiones celulares (Moore et al., 2013). La DNMT3L no posee sitio catalítico pero actúa en conjunto con 3A y 3B para el reclutamiento de histonas desacetilasas (Deplus et al., 2002). Con una función contraria a las enzimas DNMTs se encuentran las proteínas TET (Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase), que son las responsables de la demetilación activa del ADN ya que catalizan la conversión de 5-metilcitosina (5-mC) a 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) (Branco et al., 2012), que constituye un paso intermedio para llegar a la citosina sin metilar. La actividad enzimática de las TET es dependiente de hierro y alfa-cetoglutarato.

Los cambios dinámicos en la metilación del ADN durante la embriogénesis son esenciales para el desarrollo. La impronta genética, fenómeno relacionado con la expresión génica diferencial dependiente del origen parental, también se relaciona con la metilación del ADN (Reik and Walter, 2001). También desempeña un papel fundamental en el proceso de inactivación del cromosoma X, en el envejecimiento y la senescencia celular (Zampieri et al., 2015). Además, las alteraciones en los patrones de metilación son la causa de determinadas patologías, como el Síndrome X frágil, el Síndrome ICF (Immunodeficiency, Centromere instability and Facial) o el Síndrome de Rett caracterizado por la pérdida de impronta del gen *DLX5* (Horike et al., 2005). Las

INTRODUCCIÓN

anormalidades en los mecanismos de impronta también conducen a síndromes como Prader–Willi, Angelman y Beckwith–Wiedemann (Robertson, 2005).

2. Cáncer.

Según el análisis de diferentes meta-estudios, los factores extrínsecos al individuo están seriamente implicados en la aparición del cáncer. Dichos factores se categorizan en dos grupos según el grado de influencia. Aquellos que exhiben un papel importante en la adquisición de estas enfermedades; como por ejemplo el hábito tabáquico, causante de aproximadamente 6 millones de muertes anuales, ya sea por cáncer u otras enfermedades relacionadas (Glynn et al., 2010). Dentro de un segundo grupo se encuentran los riesgos ocupacionales, la exposición a radiaciones, la polución, determinados fármacos y los carcinógenos naturales.

Un elemento clave en el estudio del cáncer radica en el conocimiento de su biología. Objetivo complejo, puesto que el cáncer engloba no solo una enfermedad, sino un gran número de ellas y por ende múltiples mecanismos que a su vez están influenciados por los factores extrínsecos mencionados. Los resultados de los esfuerzos en la comprensión del cáncer han permitido generar áreas de conocimiento como la genética, epigenética, la inmunología, el metabolismo y la biología molecular cuyos avances contribuyen a entender el comportamiento de estas patologías y al desarrollo de terapias eficientes.

2.1. Cáncer de Ovario.

Las primeras hipótesis sobre la biología del Carcinoma Epitelial de Ovario (CEO) postularon que éste se originaba en la superficie epitelial de este órgano (Hamilton, 1992). Hoy en día se conoce que tal afirmación no es cierta, puesto que el CEO comprende diversos subtipos histológicos que varían en cuanto al origen de la lesión, alteraciones moleculares y predicción, entre otros factores. Debido a estas características, el CEO es identificado como el compendio de diversas enfermedades cuyo diagnóstico, estudio, comportamiento y tratamiento deberían ser llevados a cabo individualmente.

El CEO es la segunda neoplasia ginecológica en incidencia y la primera en mortalidad en el mundo. Se diagnostica en edades comprendidas normalmente entre 55 y 65 años, y como principales factores de riesgo se hallan la nuliparidad,

INTRODUCCIÓN

alumbramiento después de los 30 años y una fuerte historia familiar de cáncer de ovario o mama. Por otro lado la lactancia, los embarazos, la histerectomía y la ligación tubárica se caracterizan por ser factores protectores. Recientemente se ha publicado el primer estudio prospectivo donde se postula que los ciclos menstruales irregulares, así como los largos periodos de ausencia de los mismos son situaciones que propiciarían la aparición del cáncer de ovario. Tal hecho podría conllevar a una reclasificación de los fenotipos de alto riesgo así como el desarrollo de nuevas estrategias de cribado (Cirillo et al., 2016).

2.1.1. Clasificación del CEO.

- *Clinicopatológica.*

Esta forma de clasificación permite esclarecer el estado de la enfermedad con fines predictivos y pronósticos. Una herramienta utilizada por los clínicos para identificar el estadio es el sistema TNM, a través del cual se describen parámetros fundamentales como el tamaño del tumor primario y su ubicación (**T**), si existe o no diseminación a ganglios linfáticos y en qué número (**N**), y si el tumor ha metastatizado, hacia qué lugar y en qué grado (**M**). Estos resultados junto con la clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) permite obtener una perspectiva integral de la enfermedad y dirigir de manera más eficaz y precisa los abordajes necesarios en cuanto a seguimiento y tratamiento. Esta clasificación se describe así:

Estadio I de FIGO: el cáncer se encuentra solo en los ovarios.

Estadio II de FIGO: el cáncer se encuentra en uno o ambos ovarios y se ha diseminado por debajo de la pelvis.

Estadio III de FIGO: el cáncer se encuentra en uno o ambos ovarios y se ha diseminado fuera de la pelvis y hacia los ganglios linfáticos circundantes.

Estadio IV de FIGO: el cáncer se ha diseminado hacia órganos más allá de los ovarios.

- *Histopatológica.*

Alrededor del 90 % de los casos de CEO son epiteliales y el restante corresponde a los originados de células estromales sexuales y células germinales (Rosen et al., 2009). Actualmente los estudios genéticos, inmunohistoquímicos y morfológicos han permitido catalogar a los diferentes subtipos del CEO en dos categorías. Los de Tipo I son aquellos de bajo grado, de diagnóstico en etapas iniciales y confinados usualmente al ovario y que además exhiben mutaciones específicas en genes como

INTRODUCCIÓN

KRAS, *BRAF*, *ERBB2*, *CTNNB1*, *PTEN*, *PIK3CA*, *ARID1A* y *PPPR1A* (Kurman and Shih le, 2011). Dentro de este grupo se encuentran los subtipos endometroide, de células claras, mucinosos, el tumor de Brenner así como los serosos de bajo grado.

Dentro de la biología del cáncer de ovario se reconoce que los subtipos endometroide y de células claras tienen como lesión precursora la endometriosis, mientras que en lo que respecta al mucinoso no se conoce con exactitud su origen. La categoría del Tipo II está compuesta por el Carcinoma Seroso Epitelial de Alto Grado (HGSOC por sus siglas en inglés) cuya principal marca genética son las mutaciones en *TP53*. Este subtipo exhibe igualmente mutaciones en *BRCA 1* y *BRCA 2* o su silenciamiento debido a marcas epigenéticas, específicamente a la metilación del ADN (Kurman and Shih le, 2011). Este subtipo comprende alrededor del 75% de los casos de CEO, y se diferencia de los demás principalmente por su mal pronóstico, diagnóstico tardío y una alta respuesta inicial a la quimioterapia. Se ha propuesto que el HGSOC se origina en las células que conforman las fimbrias de las trompas de Falopio las cuales migran posteriormente al epitelio ovárico (Kurman and Shih le, 2010).

- *Diferenciación.*

A través del grado de diferenciación puede establecerse la similitud entre células tumorales y normales. Cuando la neoplasia está conformada por células parecidas al tejido sano, el tumor es considerado como diferenciado o de bajo grado, siendo de mejor pronóstico. Este tipo de clasificación se establece de la siguiente manera:

- **GX:** no se puede evaluar el grado.
- **GB:** se considera que el potencial canceroso del tejido es bajo. Esto se conoce frecuentemente como bajo potencial maligno (Low Malignant Potential, LMP).
- **G1:** Bien diferenciado. $\leq 5\%$ de componente sólido no escamoso.
- **G2:** Moderadamente indiferenciado. 6-50% de componente sólido no escamoso. Si un G1 tiene una atipia nuclear excesiva para un G1, sube a G2.
- **G3:** Pobremente diferenciado. $> 50\%$ de componente no escamoso o denominado también de alto grado.

- *Resistencia a Tratamiento.*

A pesar de la respuesta positiva inicial observada con las primeras líneas terapéuticas, la mayoría de mujeres con cáncer de ovario recaen. Por tanto, la

INTRODUCCIÓN

clasificación del tumor también se distribuye en tres grupos según el comportamiento frente a las terapias para así establecer los esquemas más adecuados: refractario a platino, resistente a platino y respondedor a platino. De estos, la categoría perteneciente al grupo refractario la componen aquellas mujeres que no responden a la terapia y exhiben progresión de la enfermedad durante el tratamiento. En el grupo resistente se observa una respuesta inicial seguida de una recaída dentro de los 6 primeros meses una vez terminado el último ciclo de quimioterapia, tiempo conocido como intervalo libre de platino. Finalmente, aquellos pacientes con un periodo libre de recurrencia mayor de 6 meses son considerados como sensibles a platinos. En este tipo de pacientes el re-tratamiento con platinos muestra una respuesta de hasta un 62%, respuesta que depende del intervalo libre de platino de cada mujer (Pfisterer and Ledermann, 2006).

- *Molecular.*

La caracterización molecular en este tipo tumoral es compleja debido a las profundas variaciones genéticas, principalmente en las anomalías en los mecanismos de reparación del ADN. En el año 2011 el proyecto TCGA (The Cancer Genome Atlas) analizó la expresión de ARN mensajero, microARNs, la metilación de promotores y los cambios en el número de copias en el ADN de 489 muestras de HGSOV, además de la secuenciación exómica en 316 de estas muestras. El hallazgo más significativo fue la mutación de *TP53* en el 96% de las muestras en este subtipo. Además, se identificaron 4 perfiles de metilación que involucraron 168 genes diferencialmente metilados en sus regiones promotoras, 3 perfiles relacionados con expresión de microRNAs y 4 subtipos transcripcionales denominados *inmunoreactivo*, *diferenciado*, *mesenquimal* y *proliferativo* (Cancer Genome Atlas Research, 2011). A pesar de este esfuerzo de integración molecular, desafortunadamente no se hallaron diferencias clínicas entre los subtipos encontrados

2.1.2. Rutas implicadas en el CEO.

La secuencia de eventos relacionada con la patogénesis del cáncer de ovario incluye la activación de diversas vías implicadas en metabolismo, proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis. En la oncogénesis del CEO se ha visto implicada la ruta del Ácido Lipofosfatídico (LPA) en un 90% de los casos (Toss et al., 2013). Se han detectado cambios en el número de copias o en la expresión de genes implicados en las vías RB y PI3K/RAS en el 67% y 45% de los casos respectivamente, y como ya se ha mencionado en apartados anteriores, la mutación extensiva en el gen *TP53* (Cancer Genome Atlas Research, 2011). Así mismo, en menos del 50% de los

INTRODUCCIÓN

casos, la vía MAPK también se ha visto afectada (Toss et al., 2013). En la figura 1 se representan las vías más frecuentemente alteradas en CEO junto con sus genes correspondientes, indicando su frecuencia de afectación y si su actividad esta aumentada o disminuida, además de las frecuencias de metilación.

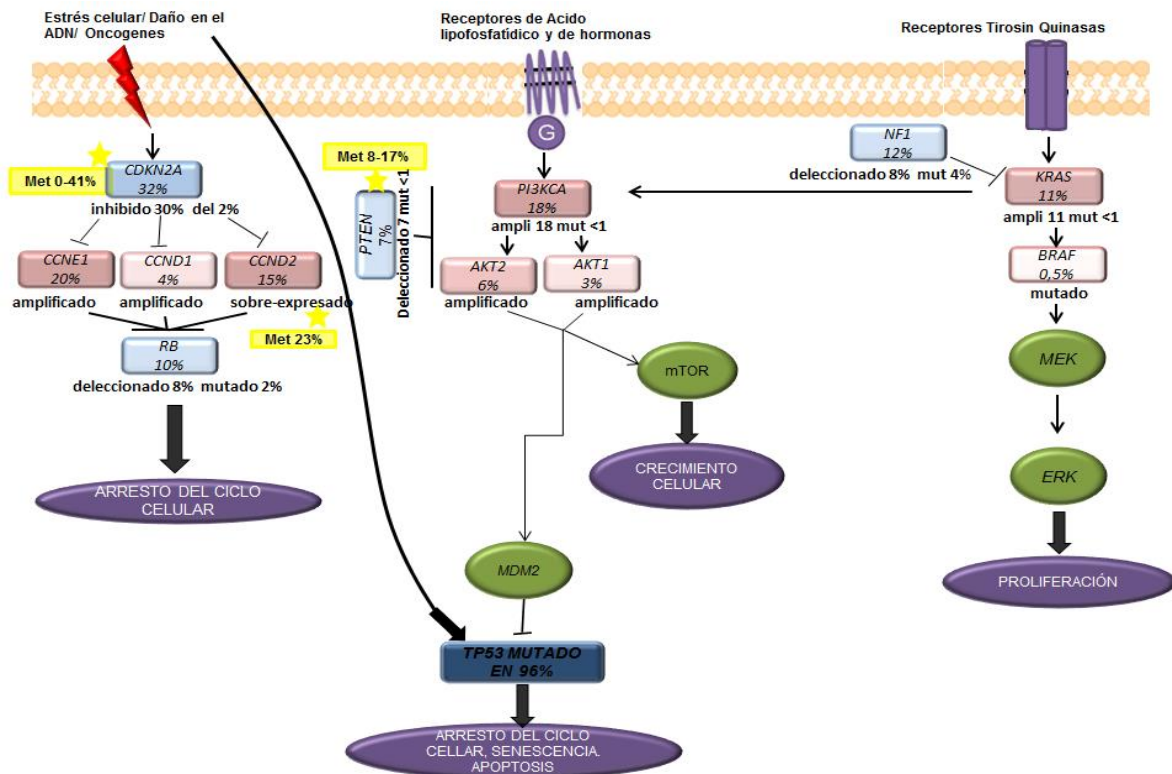


Figura 1. Rutas biológicas implicadas en la génesis del CEO. Se muestran los principales genes relacionados con la biología del cáncer de ovario describiendo las frecuencias encontradas de sobre-expresión, inhibición, mutación o metilación. Los genes sobre-expresados o amplificados se destacan en rojo mientras que aquellos que están deleciónados o inhibidos se representan en azul.

2.2. Metilación del ADN en el Cáncer.

Numerosos estudios avalan la relación entre la metilación en islas CpG con el inicio de la enfermedad o el curso de la misma, así como con la respuesta al tratamiento. En las células tumorales se observa hipometilación global y una hipermetilación específica. La primera situación conlleva a inestabilidad de microsátélites, fallos en la activación de trasposones, reorganizaciones ADN/cromosomas y alteraciones en la conformación de los cromosomas (Ehrlich, 2005). El segundo acontecimiento es la hipermetilación específica de locus, que suele hallarse en islas CpG coincidentes con regiones promotoras. La hipermetilación suele estar asociada con el silenciamiento de Genes Supresores de Tumor (GST) relacionados con la reparación del ADN, el control

INTRODUCCIÓN

del crecimiento y la proliferación celular, entre otros mecanismos. Por otro lado, la hipometilación usualmente es sinónimo de la activación de la expresión y en cáncer implica a genes relacionados con la oncogénesis (Nguyen et al., 2014). Se han descrito genes bajo regulación epigenética involucrados en diversas vías, como transducción de señales (*APC*), reparación del ADN (*MGMT*, *MLH1* y *BRCA1*), detoxificación (*GSTP1*), regulación del ciclo celular (*p15*, *p16* y *RB*), diferenciación (*MYOD1*), angiogénesis (*THBS1* y *VHL*) y apoptosis (Caspasas, *p14*, y *DAPK*). El gen *MGMT* es uno de los ejemplos más representativos en la búsqueda de biomarcadores, ya que la inhibición de su expresión debido a la metilación del promotor se ha asociado con una respuesta favorable a temozolamida en pacientes con glioblastoma que presenten dicha metilación (Hegi et al., 2005). Según la teoría de los “Dos Eventos” de Knudson (Two Hits), se necesitan dos acontecimientos para inactivar el par de alelos de un GST y así propiciar el inicio de un proceso maligno (Knudson, 1971). La hipermetilación del ADN en uno de estos alelos puede ser considerada como uno de estos dos eventos, teniendo la misma consecuencia funcional que una aberración genética.

2.2.1. Metilación del ADN en Cáncer de Ovario.

La metilación del promotor del gen *BRCA1* ha sido ampliamente analizada tanto en cáncer de ovario como en cáncer de mama. Dicha hipermetilación conduce al silenciamiento de este gen (Baldwin et al., 2000) y se encuentra entre el 10 y el 15% de los casos esporádicos de CEO. Este evento se halla frecuentemente asociado a la pérdida de heterocigosidad en este locus y con un mal pronóstico en estos pacientes (Baldwin et al., 2000). Se ha demostrado en líneas tumorales de mama y ovario que la metilación de *BRCA1* está relacionada con la sensibilidad a los fármacos inhibidores de PARP (poly adenosine diphosphate-ribose polymerase) (Stordal et al., 2013, Veeck et al., 2010), situación que puede convertirse en una futura alternativa de tratamiento en pacientes con estos tipos de cáncer. Entre los genes más frecuentemente metilados en CEO se encuentra el gen *OPCML*, que codifica para una molécula de adhesión y cuya sobreexpresión ha permitido observar la disminución del crecimiento celular tanto *in vivo* como *in vitro* en carcinoma de ovario (Sellar et al., 2003, Zhou et al., 2014). Diferentes estudios han evaluado la metilación de este gen. Xing et al/ determinaron una frecuencia de metilación del 77% en las muestras tumorales además de una asociación de la metilación con el estadio y el subtipo tumoral, encontrándose más frecuentemente metilado en mucinosos y serosos (Xing et al., 2015). Otro gen con alta frecuencia de metilación es *DAPK*. Collins et al. describieron la metilación de este

INTRODUCCIÓN

gen en 20 de 30 pacientes (67%) (Collins et al., 2006). *DAPK* es una quinasa proapoptótica que juega un papel en el desarrollo de metástasis y cuya metilación se manifiesta en diversos cánceres (Chen et al., 2014). Dentro de los niveles de hipermetilación moderada se encuentra *HOXA9* hipermetilado en un 51% de los casos y con una correlación entre metilación, estadio tumoral y subtipo, siendo mayor la metilación en tumores en estadios iniciales y en el tipo endometroide (Wu et al., 2007). También se encuentra en este grupo *GATA4*, cuya hipermetilación se ha observado en un 30% en muestras de tipo endometroide (Chmelarova et al., 2013). *GATA4* pertenece a una familia de factores de transcripción involucrados en la morfogénesis y la diferenciación celular. *RASSF1A* es un GST cuya inhibición de su expresión se ha asociado igualmente a su metilación, con una frecuencia de entre el 10% al 50% en tumores de ovario. Zuberi *et al.* encontraron metilado este gen con una frecuencia del 34% analizando todos los subtipos, hallando una relación significativa entre los subtipos seroso y mucinoso (Zuberi et al., 2014). Una característica importante de este gen es que su reactivación farmacológica media la re-sensibilización en los pacientes tratados con platinos, observándose un incremento en los periodos libres de progresión (Matei et al., 2012). Otro importante GST es *PTEN*, cuyo papel se ha destacado en numerosos tumores. Su actividad lípido fosfatasa es crítica en su función anti-oncogénica ya que antagoniza la ruta PI3K-AKT/PKB. Afortunadamente este gen presenta baja frecuencia de metilación en CEO encontrándose metilado entre un 8-17% entre los diferentes subtipos (Zuberi et al., 2014). Al igual que *PTEN*, *hMLH1* pertenece al grupo de genes que presentan baja frecuencia de metilación, entre un 2-13% en CEO (Ehrlich, 2005, Strathdee et al., 2001, du Bois et al., 2003). La función de *hMLH1* es la de reconocer el daño en el ADN y activar señales apoptóticas. Esta actividad puede encontrarse afectada en el CEO debido en parte a la metilación de su región promotora. La inhibición de la expresión de *hMLH1* se ha observado en la recaída de pacientes, hecho que se relaciona con la resistencia en las terapias basadas en platinos en CEO (Luqmani, 2005). De forma similar a lo que sucede con *RASSF1A*, la disminución en la metilación de *hMLH1* a través de fármacos permite lograr la re-expresión del gen. Esta reactivación ha sido observada en tumores humanos xenógrafos, y ha permitido conseguir una sensibilización hacia derivados del platino en este tipo de muestras (Plumb et al., 2000). La frecuencia de metilación de los genes más representativos se describe en la tabla 1.

INTRODUCCIÓN

GEN	PORCENTAJE DE METILACION	MUESTRAS ANALIZADAS	REFERENCIAS
Metilación Alta			
<i>OPCML</i>	33-83%	Serosos y no serosos	(Xing et al., 2015, Czekierdowski et al., 2006, Sellar et al., 2003)
<i>HSulf-1</i>	75%	Sin especificar	(Staub et al., 2007)
<i>GATA4</i>	60%	Células claras, endometroide.	(Chmelarova et al., 2013)
<i>CDH13</i>	13-67%	Células claras, endometroide, mucinoso, indiferenciado, adenocarcinoma	(Ozdemir et al., 2012, Wu et al., 2007)
Metilación intermedia			
<i>DAPK</i>	0-67%	Células claras, endometroide, mucinoso, indiferenciado	(Collins et al., 2006, Ibanez de Caceres et al., 2004)
<i>BRCA1</i>	5-31%	Seroso, células claras, endometroide, mucinoso, indiferenciado, adenocarcinoma	(Esteller et al., 2000, Ibanez de Caceres et al., 2004)
<i>CDKN2A (p16)</i>	0-41%	Seroso, células claras, endometroide, mucinoso, indiferenciado.	(Wiley et al., 2006a, Yang et al., 2006)
<i>HOXA9</i>	51%	Seroso, células claras, endometroide, mucinoso.	(Wu et al., 2007)
<i>RASSF1A</i>	10-50%	Seroso, células claras, endometroide, mucinoso, indiferenciado, adenocarcinoma	(Agathangelou et al., 2001, Ibanez de Caceres et al., 2004, Teodoridis et al., 2005, Wu et al., 2007, Zuberi et al., 2014)
<i>IGFBP3</i>	44%	Seroso, células claras, endometroide, mucinoso, indiferenciado.	(Wiley et al., 2006b)
<i>APC</i>	11-47%	Seroso, células claras, endometroide, mucinoso, indiferenciado, adenocarcinoma	(Ibanez de Caceres et al., 2004, Makarla et al., 2005)
Metilación baja			
<i>FANCF</i>	0-28%	Serosos y no serosos	(Taniguchi et al., 2003, Wang et al., 2006)
<i>MLH1</i>	2-13%	Seroso, células claras, endometroide, mucinoso, indiferenciado.	(Strathdee et al., 2001, Teodoridis et al., 2005, Wiley et al., 2006a)
<i>HOXB5</i>	12%	Seroso, células claras, endometroide, mucinoso.	(Wu et al., 2007)
<i>CDKN2B</i>	0-19%	Seroso, células claras, endometroide, mucinoso.	(Strathdee et al., 2001, Tam et al., 2007)
<i>PTEN</i>	8-17%	Seroso, células claras, endometroide, mucinoso.	(Teodoridis et al., 2005, Yang et al., 2006, Zuberi et al., 2014)
<i>MGMT</i>	4-9%	Células claras, endometroide, mucinoso, indiferenciado.	(Makarla et al., 2005, Teodoridis et al., 2005)

Tabla1. Metilación en Carcinoma de Ovario. En esta tabla se describen los principales genes hallados como metilados en los diferentes subtipos del CEO agrupados de acuerdo a su frecuencia de metilación.

INTRODUCCIÓN

2.3. Tratamiento del CEO.

Debido al fracaso en la detección temprana del cáncer de ovario, el 75% de las pacientes presentan la enfermedad en estadios avanzados en el momento del diagnóstico (FIGO III-IV) (Wright et al., 2016) y solo alrededor de un 30% de ellas poseen una supervivencia mayor a 5 años (Cho and Shih le, 2009). Estas cifras obligan a la búsqueda e identificación de estrategias terapéuticas cada vez más eficaces para lograr mejorar las tasas de supervivencia en estas pacientes.

El tratamiento por antonomasia como primera línea en el CEO está basado en los procedimientos quirúrgicos junto con el uso de fármacos antitumorales. Cuando las pacientes presentan carcinomas de bajo grado o son detectadas en estadios iniciales, usualmente sólo la cirugía es necesaria para contener la enfermedad, excepto si la paciente presenta un grado 3 de diferenciación, en cuyo caso debe instaurarse una terapia neoadyuvante. En mujeres con enfermedad avanzada la estrategia suele ser la cirugía para extirpar la mayor cantidad de tejido tumoral, seguida de terapias adyuvantes basadas en platinos junto con taxanos. Desde 1970 se ha implementado el uso de fármacos basados en platino en el tratamiento de cáncer de ovario, siendo las combinaciones entre cisplatino y carboplatino usadas desde hace 20 años. En el año 2003 se demostró que la combinación entre carboplatino mas paclitaxel (taxano) exhibía la misma eficacia que la combinación de cisplatino más paclitaxel, con la diferencia de que el primer régimen está asociado a una mejor tolerabilidad y calidad de vida (du Bois et al., 2003).

Las tasas iniciales de respuesta a quimioterapia en CEO son altas, encontrándose entre un 60-75% (Bast et al., 2009), y el porcentaje restante corresponde a aquellas mujeres refractarias. En el grupo de mujeres respondedoras, aproximadamente un 70% de ellas recae (Agarwal and Kaye, 2003), situación que implica recurrir a enfoques terapéuticos que dependen del tiempo libre de platino del paciente así como de la situación clínica del mismo. Los tratamientos convencionales del CEO se describen en la siguiente tabla.

INTRODUCCIÓN

ESTADO	CIRUGIA	QUIMIOTERAPIA DE PRIMERA LINEA
Figo I-II	La resección óptima del tumor conduce a tasas de supervivencia de 5 años de un 90%	La terapia adyuvante es controversial en estos casos pues solo esta recomendada en pacientes con un grado 3 diferenciación.
Figo III-IV	La máxima citoreducción se logra entre un 17-87% de los pacientes. <ul style="list-style-type: none"> Histerectomía total. Linfoadenectomía. Omenectomía. Salpingo-ooforectomía bilateral. 	<ul style="list-style-type: none"> Terapia Neoadyuvante (carboplatino + paclitaxel) Terapia adyuvante (carboplatino + paclitaxel). Esta terapia también se lleva a cabo administrando directamente CDDP intraperitonealmente <p>El esquema habitual se basa en T.N + Cx + T.A, pero ciertos estudios han mostrado que no hay diferencias significativas comparando T.N + Cx o Cx + T.A.</p>
ESTADO	QUIMIOTERAPIA DE SEGUNDA LINEA	OTRAS ESTRATEGIAS
Enfermedad recurrente.	<ul style="list-style-type: none"> Pacientes sensibles. Son re-tratados con la terapia inicial (platinos + taxanos) Paciente refractarios y resistentes: Solo se alcanzan resultados positivos en un 10-30%. La estrategia usual es la monoterapia con alguno de estos fármacos { nab-paclitaxel, doxorubicina liposomal, topotecán, gmcitabina, pemetrexed, irinotecán, etopóxi do oral }. 	<p>Existe gran expectativa con el uso de nuevos agentes.</p> <ul style="list-style-type: none"> Bevacizumab (Avastin). El inhibidor de PARP, Olaparib (Lynparza): Inmunoterapia: Fármacos anti D-1/PD-L1 y CTLA-4. Terapia hormonal. Se investiga actualmente el uso de Tamoxifeno, inhibidores de la aromatasas, y enzalutamida, un bloqueador del receptor de andrógenos.

Tabla 2. Tratamiento del Carcinoma de Ovario. En esta tabla se describen los esquemas de tratamientos en CEO relacionados con el estadio de la enfermedad y su respuesta. T.N= Terapia Neoadyuvante, Cx= Cirugía, T.A = Terapia Adyuvante.

2.3.1. Resistencia al tratamiento con platinos.

La resistencia al tratamiento convencional sigue siendo uno de los principales obstáculos a vencer en el cáncer. Múltiples ensayos *in vitro* han permitido identificar tres escenarios relacionados con la fármaco-resistencia. Estos son la farmacocinética, el microambiente tumoral y los mecanismos específicos celulares (Agarwal and Kaye, 2003, Davis et al., 2014). Estos últimos se basan en mutaciones somáticas adquiridas, cambios epigenéticos o alteraciones en la fisiología celular que favorecen la viabilidad celular. Existen al menos dos mecanismos por los cuales las células tumorales evitan la acción del CDDP antes que este llegue a sus sitios diana. Ellos son la disminución de la entrada del fármaco a la célula y el aumento del secuestro citoplasmático del CDDP por moléculas como el GSH, metalotioneínas y otras proteínas (Galluzzi et al., 2012). En el escenario en el que el fármaco logra llegar a su diana y cumplir su papel, otros mecanismos median la resistencia logrando reparar el daño hecho en el ADN, o permitiendo sobrevivir a la célula a través de la activación de mecanismos de tolerancia. La mayoría de las lesiones originadas por el CDDP son reparadas por el sistema de Reparación de Escisión de Nucleótidos (NER por sus siglas en inglés) (Wood et al., 2000). Por otra parte, la resistencia post-efecto se origina en una variedad de situaciones que tienen como consecuencia la alteración de los sistemas

INTRODUCCIÓN

proapoptóticos, quienes deberían responder ante el daño en el ADN. El más importante de los fallos observados en estos sistemas es la inactivación de *TP53* (Galluzzi et al., 2012). A nivel traslacional se cree que aquellos pacientes que responden al tratamiento con platinos son portadores de tumores con poblaciones mixtas de clones tumorales sensibles y resistentes *per se*. Estos últimos pueden expandirse y promover la recurrencia, situación que correspondería a una resistencia intrínseca. Por otro lado, la fármaco resistencia puede originarse por el propio tratamiento, ya que se ha observado que la continua exposición a estos fármacos propicia ciertos fenómenos intracelulares a nivel genético y epigenético relacionados con el fracaso terapéutico.

2.3.2. Mecanismos epigenéticos que median la resistencia a platinos en el CEO.

Sumado a los factores de índole genética que median la resistencia, en el 2010, Sharma *et al.* postularon que las aberraciones epigenéticas, en este caso a través de la modificación del estado de la cromatina (Sharma et al., 2010), también forman parte de las estrategias usadas por las células tumorales para evadir la acción de este tipo de fármacos. Sin embargo, la evaluación del estado de la metilación del ADN es la estrategia más ampliamente usada para comprender la resistencia en el contexto epigenético.

Dentro de la resistencia adquirida se ha atribuido un papel importante a la metilación del gen proapoptótico *hMLH1*, uno de los más estudiados en cáncer de ovario. Pacientes con CEO muestran un incremento en la metilación de este gen cuando reaparece la enfermedad y después de 4 ciclos o más de quimioterapia basada en platinos (Watanabe et al., 2007). Esta metilación se ha detectado en un 25% de los pacientes en el momento de recurrencia y ha sido observada en el ADN tumoral libre, asociándose con una baja supervivencia global (Gifford et al., 2004). Una situación similar ocurre para genes como *RASSF1A*, *HOX10* y *HOX11* cuyo tratamiento con inhibidores de la metilación favorece la respuesta hacia carboplatino en pacientes recurrentes, observándose una correlación positiva entre la restauración de la actividad de estos genes y periodos libres de enfermedad prolongados (Matei et al., 2012). Recientemente se ha identificado el papel que juega una familia de proteínas encargadas de regular la actividad de las proteínas G en carcinoma de ovario. Esta superfamilia es conocida como RGS (Regulators of G Protein Signaling) y está compuesta por alrededor de 30 miembros. Uno de ellos es RGS10, una GTPasa que controla la actividad de las proteínas G y que es un importante regulador de la

INTRODUCCIÓN

viabilidad celular. El papel que desempeña RGS10 en la supervivencia celular se ha evidenciado en CEO, ya que la disrupción de la transcripción debida a la metilación de su promotor parece conferir resistencia a las células tumorales (Cacan et al., 2014).

El efecto principal de los fármacos basados en platinos es la formación de aductos de ADN intra o intercatenarios. Sin embargo, esta característica de provocar daño nuclear no es suficiente *per se* para explicar del todo sus mecanismos efectores. Se ha observado la activación del metabolismo del oxígeno en diversos tejidos una vez son expuestos al cisplatino, generando la formación de subproductos conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS) que median el daño oxidativo y la magnificación del efecto de estos fármacos (Marullo et al., 2013). El incremento en la producción de estas moléculas conduce a un estrés oxidativo que propicia la toxicidad debido a la formación de peróxidos y radicales libres, que afectan a todos los componentes celulares a través de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y de aminoácidos. La generación de ROS puede tener una relación directa con las alteraciones epigenéticas, específicamente la metilación del ADN. Niu *et al.* a través de un modelo *in vitro* encontraron una relación entre la disminución de la actividad de las proteínas TET y el estrés oxidativo, puesto que las ROS oxidan los cofactores Fe (II), KG y ascorbato, los cuales son necesarios para el funcionamiento de estas enzimas. De igual manera observó una disminución global en la acetilación de histonas debido al aumento en la actividad de histonas desacetilasas (I/II HDAC) ocasionado por el estrés oxidativo (Niu et al., 2015). Este escenario de alteraciones epigenéticas es sinónimo de silenciamiento génico, ya sea por fallos en la hidroximetilación del ADN, lo cual redundaría en altos niveles de metilación, o por el estado cerrado de la cromatina. Otra anomalía epigenética relacionada con ROS implica la activación de RAS por parte de estas moléculas. El bloqueo intencional de la adherencia de melanocitos tumorales *in vitro* favorece el inicio de estrés oxidativo con el consecuente aumento en la producción de ROS y mayor metilación global en esas células en suspensión. Esta hipermetilación es causada por el aumento en la expresión de la enzima DNMT1, favorecida por la actividad exacerbada de RAS. Las especies reactivas de oxígeno como el ión superóxido tienen la capacidad de activar RAS, hecho que permite asociar el estrés oxidativo con la hipermetilación observada en este escenario (Campos et al., 2007).

Existen fármacos de tratamiento epigenético que permiten la re-expresión de GST permitiendo así vencer la resistencia a platinos. Estos son fundamentalmente inhibidores de DNMTs e inhibidores de desacetilasas de histonas. Entre los primeros se encuentran Vidaza, Dacogen, Zolanza y SGI-110 (guadecitabina). SGI-110 ha

INTRODUCCIÓN

mostrado ejercer un rol en la recuperación de la sensibilidad hacia platino en pacientes resistentes en cáncer de ovario (Ursula A. Matulonis, 2016). Entre los inhibidores de desacetilasas de histonas están Istodaz y Panobinostat, siendo este último el de más reciente aceptación por la FDA (Food and Drugs Administration) (Laubach et al., 2015).

3. Técnicas de abordaje masivo para el estudio de la metilación de ADN.

Antes de la revolución tecnológica de los cribados de alto rendimiento, la búsqueda de biomarcadores se basaba en la metodología de arrays diseñados para la detección de mutaciones, cambios en la expresión génica o análisis de metilación. Gracias al avance tecnológico de los últimos años, las técnicas de secuenciación masiva o “Next Generation Sequencing” (NGS) están reemplazando a las antiguas metodologías y se han convertido en uno de los mayores hitos de los últimos 30 años en la investigación bioclínica. La NGS otorga hoy en día la posibilidad de analizar genomas simultáneamente en un mismo equipo con carreras cada vez más cortas y protocolos menos complejos, disminuyendo los costes. El principal objetivo de estos enfoques es obtener una visión global de los perfiles genéticos, transcripcionales o epigenéticos de muestras de distinta procedencia, permitiendo de esta manera una mejor y mayor adquisición del conocimiento biológico y biomédico.

3.1. Técnicas masivas de expresión génica.

- Microarrays de expresión.

Los arrays son tecnologías empleadas para determinar la variación en la expresión génica basada en el uso de miles de sondas específicas que hibridan con el ADNc diana. Estas sondas se fijan a una superficie sólida que puede ser vidrio, plástico o silicona y su unión con el ADNc se monitoriza de manera simultánea determinando el grado de hibridación mediante fluorescencia a través de análisis de imagen, lo que finalmente indica el nivel de expresión de miles de genes, y suelen utilizarse para identificar genes con una expresión diferencial según las condiciones analizadas. Dentro de sus principales desventajas se encuentran la aparición de artefactos de hibridación cruzada, la deficiente identificación de genes expresados en niveles bajos, problemas en la detección basada en fluoróforos y dificultades con el diseño de sondas que limitan la detección de genes sin mapear (Casneuf et al., 2007).

INTRODUCCIÓN

- Secuenciación del Transcriptoma (RNA-seq).

Una de las principales ventajas en la secuenciación global del transcriptoma por RNA-seq es que no hay necesidad de un conocimiento previo sobre los transcritos de interés, esto gracias a las lecturas de final pareado que permiten obtener una distancia estimada entre dos puntos de un transcrito, identificando de esta manera patrones de reordenamiento transcripcional aunque estos no hayan sido descritos anteriormente. Como todas las tecnologías NGS, este método está basado en la construcción de librerías que son amplificadas y secuenciadas. Teniendo como origen el ARN, es necesario llevar a cabo una retro-transcripción para obtener cDNA y realizar la posterior secuenciación. Este es un paso fundamental en el desarrollo del RNA-seq ya que siendo esta molécula tan lábil, es necesario aplicar especiales condiciones de manejo de la muestra, para conseguir una eficiente retro-transcripción en términos de calidad y suficiente cantidad de ADNc y evitar sesgos. El RNA-seq permite la identificación de nuevos transcritos, fusión de genes y el establecimiento de los límites reales de los genes gracias a la exactitud con que se identifican los límites 3' y 5' así como la identificación de nuevas regiones UTR's (Untranslated Region).

3.2. Técnicas masivas en la metilación del ADN.

Debido a que las marcas de metilación no se conservan durante las amplificaciones del ADN, existen diversos enfoques basados en alternativas como la modificación química del ADN por bisulfito o el enriquecimiento de la muestras antes de llevar a cabo la secuenciación, obteniéndose así diversas metodologías en la determinación a gran escala de la metilación del ADN, tabla 3.

3.2.1. Metodologías basadas en la modificación del ADN por bisulfito.

El tratamiento con bisulfito de sodio introduce modificaciones químicas que permiten discriminar entre citosinas metiladas y no metiladas en un contexto CpG, eliminando el sesgo relacionado con las secuencias repetitivas ricas en CpG como lo son las secuencias ALU y LINE. Este tratamiento transforma un evento epigenético en uno genético puesto que las citosinas no metiladas son deaminadas a uracilos más rápidamente que las citosinas metiladas, manteniéndose así la marca de metilación durante las amplificaciones posteriores de PCR.

* **RRBS** (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) o Secuenciación por Bisulfito de Representación Reducida. Esta metodología combina el uso de enzimas de

INTRODUCCIÓN

restricción no sensibles al estado de metilación junto con el tratamiento con bisulfito, generando librerías que posteriormente se secuenciarán con un nivel de resolución por base, pero con una cobertura de solo 2 millones de dinucleótidos CpG (Soto et al., 2016) .

* **WGBS** (Whole Genome Bisulfite Sequencing) o Secuenciación por Bisulfito del Genoma Completo. En esta técnica el ADN es modificado por bisulfito y posteriormente se elaboran las librerías necesarias para llevar a cabo la secuenciación masiva, la cual permite conocer el estado de metilación de todas las posiciones CpG del genoma a un nivel de resolución igual a RRBS, lo que redundará en el verdadero metiloma de la muestra analizada.

* **Paneles dirigidos.** Otra manera de abordar de forma masiva la metilación del ADN es a través del enriquecimiento de la muestra, seleccionando las regiones de interés a través de sondas diseñadas para hibridar con posiciones CpG determinadas y con una resolución por base. Este método combina las mismas tecnologías que en WGBS, pero los fragmentos se hibridan con numerosas sondas específicas. Por ejemplo, “SeqCap Epi CpGiant” de Roche interroga 5 millones de posiciones CpG. Estas metodologías actúan como una herramienta de cribado con el fin de identificar regiones específicas que se encuentren diferencialmente metiladas en el genoma y en las dos cadenas del ADN, para de este modo poder discriminar entre estos cambios y posibles polimorfismos.

* **Arrays.** Aunque las anteriores herramientas permiten conocer el estado de metilación desde una perspectiva global que sería el escenario ideal, el enfoque más ampliamente usado y que no corresponde con NGS son los arrays de metilación, puesto que confieren ventajas en cuanto a coste, análisis, tiempo de desarrollo y además exhiben una resolución igual a WGBS y RRBS. Dentro de estas matrices la más usada es el “Infinium HumanMethylation 450 BeadChip Kit” de Illumina, cuyas sondas permiten conocer el estado de metilación de aproximadamente 450 mil posiciones CpG cubriendo el 96% de las Islas CpG conocidas. Recientemente se ha implementado una versión actualizada “MethylationEPIC BeadChip” (850K) que cubre aproximadamente 900 mil posiciones CpG.

INTRODUCCIÓN

	WGBS	MEDIP-seq	METHYL-CAP-seq	RRBS	Sure Select Methyl-seq	Human methylation 450k
Resolución	Una base	~150 pb	~150 pb	Una base	Una base	~Una base
Lecturas por muestra	>500 millones	50 millones	30 millones	10 millones	50 millones	Microarray
Detección de SNP	Si	Si	Si	Si	Si	No
Enriquecimiento	No	Si	Si	Si	Si	No
Regiones Cubiertas	>28 millones de CpGs	~23 millones de CpGs	~23 millones de CpGs	~2 millones de CpGs (85% of Islas CpG y 60% de promotores)	3.7 millones de CpGs (islas, "shores" y "shelves", sitios hipersensibles para DNase I, genes Refseq, características regulatorias de Ensembl)	485,000 CpGs (96% de islas CpG "shore" y "shelves", 99% de promotores RefSeq, sitios metilados no-CpG and promotores de miRNAs)
Regiones no cubiertas	--	CpGs en todo el genoma y metilación no-CpG Áreas con baja densidad de 5mC no son cubiertas	CpGs en todo el genoma y metilación no-CpG Áreas con baja densidad de 5mC no son cubiertas	CpGs en áreas sin los sitios de restricción enzimática	Regiones sin sondas diseñadas	Regiones fuera de la plataforma
Pros	Cubrimiento de regiones densas y no tan densas en CpGs así como regiones repetitivas dense La sonicación y fragmentación evitan sesgos relacionados con la detección de sitios específicos	La selección basada en anticuerpos es independiente de la secuencia y evita el enriquecimiento en de regiones 5hmC gracias a la especificidad del anticuerpo. Mayor sensibilidad que METHYL-CAP en regiones de baja densidad de CpGs	Las proteínas MBD no interactúan con 5hmC. MBD es más sensible que MEDIP en regiones con alta densidad de CpGs como las islas CpG	Alta sensibilidad a bajo costo a través de la secuenciación de una muestra reducida y representativa de todo el genoma.	Las sondas son diseñadas a partir de la secuencia primaria del ADN y no está condicionada por la densidad de CpGs ni afectada por el estado de metilación inherente de la muestra. La sonicación y fragmentación evitan sesgos relacionados con la detección de sitios específicos	La técnica más ampliamente usada y estandarizada para el análisis de datos.
Cons	La conversión por bisulfito no permite discriminar 5mC y 5hmC. Alta cantidad de ADN de partida	La selección basada en anticuerpos está sesgada hacia regiones	La selección basada en proteínas está sesgada hacia regiones	Las enzimas de restricción cortan en sitios específicos conduciendo a un sesgo en la selección de la (densidad de CpGs)	Se interrogan regiones candidatas específicas, no todo el genoma	Las sondas dependen del estado de metilación.

Tabla 3. Metodologías de análisis de metilación. Las principales técnicas de análisis de metilación se agrupan en aquellas basadas en el tratamiento químico del ADN por bisulfito o en el enriquecimiento de la muestra previo a la secuenciación.

3.2.2. Metodologías sin conversión del ADN.

Dentro de las metodologías relacionadas con el enriquecimiento previo de la muestra, se hallan principalmente: **MeDIP-seq** (Methylation-dependent Immunoprecipitation sequencing), que consiste en el uso de anticuerpos específicos que reconocen citosinas metiladas permitiendo la captura selectiva de regiones densamente metiladas para la generación de las librerías y posterior secuenciación. **Methyl Cap-seq** (Methylation Capture sequencing) involucra el uso de proteínas recombinantes, específicamente el dominio de unión de la proteína MECP2 la cual se une al grupo metilo de las citosinas permitiendo atrapar al ADN metilado para ser

INTRODUCCIÓN

secuenciado. Estos dos enfoques poseen una cobertura y resolución similar, siendo de unos 25 millones de citosinas y 150 pares de bases respectivamente.

3.3. Análisis integrado del Cáncer.

La implementación de estas poderosas herramientas (NGS) en la investigación oncológica genera cantidades ingentes de información que se integra en bases de datos disponibles a la comunidad científica, como es el caso del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA). Estas bases son excelentes fuentes de datos obtenidos a partir de análisis masivos genómicos y epigenómicos de las que se puede extraer casi cualquier tipo de información, ya que se fundamentan en una variedad de plataformas que incluyen ARNm, microARN, secuenciación del ADN junto con número de copias, metilación y análisis proteómicos, sumado a la información clínica parcial de los pacientes. El TCGA comprende datos de 33 tipos tumorales y 10 cánceres raros que engloban muestras procedentes de 14.000 pacientes. La información extraída del TCGA sobre diversos tipos tumorales evidencia que los estudios genéticos superan en casi 6 veces a los análisis de metilación del ADN, mostrando un elevado porcentaje en el desempeño de técnicas de secuenciación masiva, mientras que en los ensayos epigenéticos su uso es ínfimo (Soto et al., 2016) .

Se espera que la aplicación de las técnicas NGS en la epigenética sea de uso casi imperativo en los próximos años debido al frenético ritmo de esta disciplina y a la necesidad de obtener información relevante y certera sobre el cáncer y otras enfermedades. Las tasas de envejecimiento de la población europea aumentan progresivamente y este hecho se encuentra íntimamente ligado con el aumento en la incidencia del cáncer, por lo que el papel de estas nuevas tecnologías será crucial en el futuro cercano tanto a nivel básico como clínico. Aunque la aplicabilidad de NGS va en alza gracias a la tendencia de reducción de costes y disponibilidad, los análisis bioinformáticos epigenéticos son más complejos que los genéticos, principalmente por la pérdida de complejidad en la secuencia del ADN tratado con bisulfito, los sesgos observados por la tendencia de la ADN polimerasa hacia regiones metiladas y la implementación de diversos algoritmos. A pesar de ello, el análisis de metilomas será más frecuente tanto en pacientes como en cualquier tipo de muestra y accesibles en la mayoría de centros de investigación. Esta cercana dimensión suscita la responsabilidad de no tomar a la ligera los resultados obtenidos a través de estas metodologías, sino por el contrario, obliga a aplicar estrategias necesarias para validar dichos hallazgos y reforzar la aplicabilidad de estas técnicas.

INTRODUCCIÓN

Los puntos claves en los que la NGS puede fallar están relacionados principalmente con el manejo de la muestra, los análisis bioinformáticos y las mismas plataformas de secuenciación, ya que estas pueden ser una fuente de variabilidad que interfiere con la reproducibilidad, la sensibilidad y la especificidad. Respecto a los estudios epigenéticos, es necesaria la validación de la NGS a través de metodologías alternativas como la secuenciación Sanger por bisulfito, MSP (Methylation Specific PCR), pirosecuenciación o qMSP (quantitative Methylation Specific PCR). La implementación de estas medidas de contingencia permitirá tener seguridad y certeza sobre aquellas moléculas identificadas y su futuro papel en la medicina personalizada.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El desarrollo de esta tesis se dividió en dos objetivos globales.

1. Identificación de potenciales biomarcadores epigenéticos con papel predictivo en la respuesta al tratamiento con platino en cáncer de ovario, en un modelo experimental con líneas celulares, mediante la optimización de parámetros bioinformáticos para el análisis de secuenciación masiva del metiloma.
2. Establecimiento de las bases de una futura matriz predictiva de respuesta a platino originada a partir del análisis global del metiloma y transcriptoma, que permita una efectiva estratificación de pacientes según su perfil biológico y clínico, capaz de predecir la evolución y posible respuesta terapéutica en cada paciente.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y METODOS

1. Líneas celulares y compuestos.

Las siguientes líneas tumorales fueron adquiridas comercialmente en American Type Culture Collection (ATCC) y European Collection of Authenticated Cell Cultures * A2780 (ECACC ® - 93112519) * OVCAR3 (ATCC ® HTB-161) * PC3 (ATCC ® CRL-1435) * BT474 (ATCC® HTB-20) * LoVo (ATCC® CCL-229) y * HeLa (ATCC ® CCL-2). Los compuestos cis-diaminodicloroplatino (CDDP) y el cis-diamino ciclobutano dicarboxilatoplatino (CBDCA) (Farma Ferrer, España) se utilizaron en la inducción de resistencia terapéutica en las líneas celulares y se cultivaron según la recomendación comercial. Para el tratamiento epigenético los fármacos empleados fueron Tricostatina A y 5-Aza-2'-deoxicitidina (Sigma-Aldrich, España).

Todas las líneas empleadas se autentificaron en el servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas Albertos Sols CSIC-UAM. La autentificación se llevó a cabo a través de la amplificación STR (short tandem repeat) mediante el kit GenePrintR 10 System (Promega, USA). Esta técnica permite la co-amplificación y detección en tres colores de 10 locis humanos: *TH01*, *TPOX*, *vWA*, *Amelogenina*, *CSF1PO*, *D16S539*, *D7S820*, *D13S317*, *D21S11* y *D5S818* los cuales son usados para la identificación y determinación de contaminación cruzada. En la siguiente tabla se muestran las diferentes líneas autentificadas.

NOMBRE	MICROS	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AMEL	TPOX	CSF1PO	D21S11	REF	COINCIDENCIA
MUESTRA	<i>M. musculus</i>												C/NC
REF A2780	Negativo	11,12	12,13	10	11,13	15,16	6	X	8,10	10,11	27,28	SIGMA	
A2780	*****	11,12	12,13	10	11,12,13	15,16	6	X	8,10	10,11	28		c
REF OVCAR3	Negativo	11,12	12	10	12	17	9,9,3	X	8	11,12		ATCC® HTB-161	
OVCAR3	*****	11,12	12	10	12	17	9,9,3	X	8	11,12	29,31,2		c
REF PC3	Negativo	13	11	8,11	11	17	6,7	X	8,9	11	29,31,2	ATCC® CRL-1435	
PC3	*****	13	11	8,12	11	17	6,8	X	8,10	12	29,31,2		c
REF BT474	Negativo	11,13	11	9,12	9,11	15,16	7	X	8	10,11	28,32,2	ATCC® HTB-20	
BT474	*****	11,13	11	9,12	9,11	15,16	7	X	8	10,11	28,32,2		c
REF LoVo	Negativo	11,12,13	8,11	9,3,10,11	9,12	17,18	9,3	X,Y	8,9	11,13,14		ATCC® CCL-229	
LoVo	*****	11,13	8,11	10,11	9,12	17,18	9,3	X,Y	8,9	0,11,13,1	29,31,2		c
REF HeLa	Negativo	11,12	12,13,3	8,12	9,10	16,18	7	X	8,12	9,10	27,28	ATCC® CCL-2	
HeLa	*****	11,12	12,13,3	8,12	9,1	16,17,18	7	X	12	9,10	27,28		c
COINCIDENCIA	C												
NO COINCIDENCIA	NC												
MUESTRA	<i>M. musculus</i>	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AMEL	TPOX	CSF1PO	D21S11		C/NC

Tabla 4. Autentificación de las líneas tumorales humanas. Las líneas tumorales utilizadas en nuestro trabajo fueron autentificadas mediante la amplificación de microsatélites de 10 locis humanos.

1.1. Establecimiento de fenotipos celulares resistentes a derivados del platino.

Se utilizaron las líneas tumorales de ovario OVCAR3 y A2780 que denominaremos a partir de este momento como parentales para obtener los fenotipos resistentes a

MATERIALES Y MÉTODOS

CDDP y CBDCA. Las células se expusieron a concentraciones crecientes de los fármacos y según su comportamiento hacia el tratamiento se decidía concederles tiempo de reposo (sin exposición), o si por el contrario se administraba una nueva dosis antes del siguiente periodo de reposo, figura 2. Se vigiló constantemente el crecimiento celular y el consumo del medio de cultivo. Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI (Lonza, Suiza) con una concentración de SFB 10% (Thermofisher, USA) para A2780 y 20% para OVCAR3 (Thermofisher, USA), 1% de Amfotericina B (Corning, USA), 1% de Glutamina (Thermofisher, USA), y 350 µl de Gentamicina (Roth, Alemania).

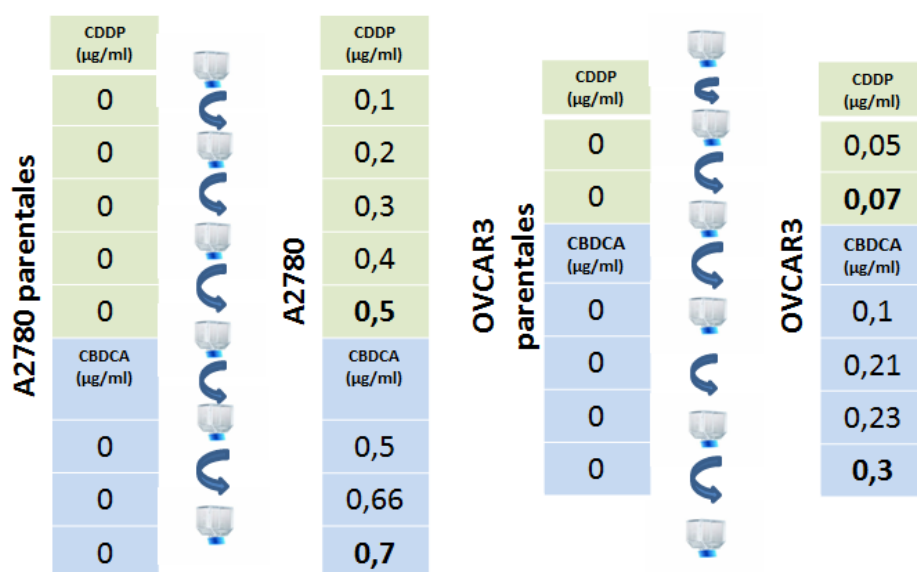


Figura 2. Esquema de adquisición de resistencia. Las líneas A2780 y OVCAR3 fueron expuestas a los derivados del platino (CDDP y CBDCA) en concentraciones crecientes dependiendo de su respuesta al tratamiento. Paralelamente se cultivaron durante el mismo periodo de tiempo las líneas parentales a las cuales no se les aplicó tratamiento. La dosis mayor de cada uno de los fármacos es aquella en la que a través de las curvas de viabilidad pudo evidenciarse que las líneas tratadas poseían una Índice de Resistencia mayor (al menos 3 veces) que su compañera parental.

Para corroborar el desarrollo de resistencia al fármaco se realizaron curvas de viabilidad por el método de tinción con cristal violeta con cada fármaco utilizado (Chattopadhyay et al., 2006). Las células se sembraron en placas de 24 pocillos en una densidad de 40.000 células por pocillo y se expusieron a concentraciones de 0, 0,5, 1, 1,5, 2 y 3 mg/µl para CDDP y 0, 1,25, 2,5, 5, 10 y 20 mg/µl para CBDCA. Las células se expusieron durante 72 horas a los fármacos antes de ser evaluadas por el método de tinción. Las células se lavaron con PBS y se fijaron con glutaraldehído al 1% (Sigma Aldrich, USA) para ser posteriormente teñidas con cristal violeta al 0,1% (Sigma Aldrich, USA). Las células se decoloraron con ácido acético al 10% (Merck, USA) y el extracto se midió por colorimetría a una longitud de onda de 595 nm para

MATERIALES Y MÉTODOS

conocer la absorbancia de cada pocillo, la cual es comparada con el control negativo de cada experimento (0g/ml). Los tratamientos se mantuvieron hasta alcanzar el índice de resistencia que se describe en el apartado de resultados.

1.2. Tratamiento epigenético de líneas celulares.

Los fenotipos resistentes de las líneas OVCAR3 y A2780 fueron sometidos a un tratamiento farmacológico con TSA (Tricostatina A) (Sigma-Aldrich, España) y 5aza – dC (5-Aza-2'-deoxicitidina) (Sigma-Aldrich, España), obteniendo de este manera un nuevo fenotipo que denominamos RT (reactivation treatment). El TSA es un fármaco que inhibe la acción de las desacetilasas de histonas (HDAC), mientras que el 5aza – dC es un análogo de citosinas que al incorporarse en el ADN secuestra a la DNMT, bloqueando de esta manera su acción metilante. Ambos tratamientos promueven el estado abierto de la cromatina y su activación transcripcional. Las concentraciones de los fármacos empleadas en este tratamiento proceden de ensayos anteriores llevados a cabo en nuestro grupo, consistentes en microarrays de expresión génica realizados a las células SW480 tratadas con dosis de 150, 300 y 500nM de TSA y 2,5 y 5µM para 5aza–dC, observándose que las concentraciones ideales para activar la re-expresión génica con menos mortalidad asociada eran las de 300nM para TSA y 5µM para 5aza. El diseño de este experimento también consistió en exponer a las células a cada fármaco por separado y también de manera conjunta, observándose que el efecto en la re-expresión génica era mucho mayor en los grupos experimentales tratados con los dos fármacos.

Los grupos celulares resistentes fueron expuestos a las concentraciones mencionadas y también se sembraron placas control sin fármaco para cada uno de los tratamientos. Para el control de TSA las células fueron tratadas con etanol y para el control de 5aza–dC se trataron con PBS. Las células fueron tratadas inicialmente con 5aza–dC. Al ser 5aza–dC un análogo de citosinas su efecto como agente demetilante depende de la capacidad de inserción en el ADN, por tanto para tener certeza de su incorporación en las dos cadenas fue necesario ir tratando las células a medida que estas se iban dividiendo asegurando por lo menos dos divisiones celulares. Posterior al tratamiento con 5aza–dC, las células fueron expuestas al TSA durante 16 horas más antes de la extracción del ARN y ADN.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. Muestras clínicas y recogida de datos.

Contamos con 169 muestras de cáncer de ovario obtenidas tanto de tumores congelados frescos como de parafina procedentes de diferentes hospitales de España. Del Hospital Universitario de la Paz (10 tumores frescos) y del IDIS-CHUS (47 tumores frescos), representando los subtipos más frecuentes de cáncer de ovario. Respecto a las muestras parafinadas contamos con 83 muestras del Hospital Parc de Salut Mar y 7 muestras de pacientes catalogados como resistentes/refractarios en estadios avanzados III/IV, pertenecientes al Centro Integral Oncológico Clara Campal. Además contamos con 39 carcinomas de alto grado (HGSOC), las cuales se obtuvieron del biobanco del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Como muestras control para los ensayos de validación se utilizó ADN de PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) procedentes de 4 donantes sanos, ADN procedente de saliva, ADN de ovarios extirpados en cirugías de cambio de sexo de 3 individuos y ADN de 13 trompas de Falopio extirpadas de ligación tubárica. Los ovarios y las trompas de Falopio se obtuvieron en colaboración con el Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario de la Paz. El seguimiento clínico de los pacientes se realizó de acuerdo a la normativa de cada hospital. Todas las muestras fueron recogidas siguiendo los protocolos aprobados por los Comités Éticos de Investigación Humana en cada centro participante, incluyendo los consentimientos informados y tras haber entregado a cada paciente la información completa sobre el estudio y su participación en el mismo. Los parámetros clínicos recopilados con el estudio incluyeron edad, tipo de carcinoma así como su histología, diferenciación y estadio, tipo de tratamiento, recurrencia de la enfermedad y supervivencia, entre otros.

3. Ensayos de expresión génica.

3.1. Microarrays de expresión génica.

Utilizamos el ARN extraído de los siguientes grupos experimentales para identificar genes con expresión diferencial entre ellos: sensibles (S), resistente (R) y resistentes con tratamiento de reactivación (RT). El ARN de los 6 grupos experimentales (A2780-S / A2780-R / A2780-RT; OVCAR3-S / OVCAR3-R / OVCAR3-RT) fue extraído mediante el protocolo de tiocianato de guanidina (McGookin, 1984) (Trizol, Invitrogen) y purificado con RNAeasy mini kit (Quiagen, USA) seguido de un tratamiento con ADNasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para amplificar y marcar el ARN se siguió el protocolo de Análisis de Expresión Génica basado en "Microarray" de un solo color (Agilent Technologies, USA). 1 µg de RNA total fue retrotranscrito usando el cebador del promotor T7 y la retrotranscriptasa de MMLV. Posteriormente el ADNc fue convertido a ARNa (amplificado) usando la ARN polimerasa T7, la cual simultáneamente amplifica el material e incorpora el fluoróforo marcado con cianina 3 (Cy3).

A continuación las muestras se hibridaron en el "Whole Human Genome Microarray" 4 x 44K (G4112F, Agilent Technologies, USA) con duplicados biológicos por cada grupo experimental. 1,65 µg de ARNa (ARN amplificado) marcado con Cy3 se incubó durante 17 horas en un horno de hibridación a 65° (G2545A, Agilent) en una concentración final de 1X en el buffer de hibridación HI-RPM según la recomendación de la casa comercial. Posteriormente los arrays se lavaron según las recomendaciones comerciales y se secaron mediante centrifugación. El escaneo se realizó a una resolución de 5 µm y las imágenes se analizaron a través del "Feature Extraction software".

Los resultados obtenidos se normalizaron a través del método VSN (Variance Stabilization Normalization) (Huber et al., 2002) el cual preserva las características biológicas de los datos y a su vez estabiliza la varianza a través de todo el rango de intensidad. Una vez normalizados los datos, se aplicaron tres tipos de filtros, por expresión, por etiqueta y por error. Este cribado llevó a que de las 41.081 sondas iniciales, solo 26.161 continuasen siendo objeto de estudio, y todas aquellas sondas que hibridaran al menos en el 50% de las muestras fueron consideradas para análisis futuros. El experimento tuvo una media de expresión mayor del percentil 20 de todas las medias de expresión y dicha expresión varió a través de las diferentes condiciones.

3.2. PCR a tiempo real.

Los resultados obtenidos a partir de los microarrays y análisis *in silico* se validaron en los 6 grupos experimentales del grupo CDDP (A2780 S / A2780 R A2780 RT; OVCAR3 S / OVCAR3 R / OVCAR3 RT). Esta validación también se llevó a cabo a nivel traslacional en las cohortes de tumores frescos. La metodología de PCR a tiempo real consta de dos pasos principales. El primer paso consistió en la retrotranscripción del ARN total partiendo de una concentración de 500 ng/µl para tumores y 1000 ng/ul para líneas celulares. Para obtener el ADNc se utilizó el kit de Takara (PrimeScript™ RT reagent Kit Perfect Real Time ID: #RR037A Condalab, España). El segundo paso

MATERIALES Y MÉTODOS

es la valoración del ADNc a través de sondas Taqman específicas (Life Technologies, España), tabla 5, y el uso de la Master Mix 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (ROX) (Genycell Biotech, España). En cada reacción se utilizaron 1,6 µl de ADNc en un volumen final de 10 µl siguiendo los parámetros establecidos por la casa comercial. Las condiciones de amplificación fueron: 15' a 95°C y 40 ciclos (15'' a 95°C, 1' a 60°C).

GEN	ENSAYO ID
PAX9	Hs00196354_m1
FKBP1B	Hs00997682_m1
GAPDH	Hs03929097_g1

Tabla 5. Ensayos utilizados para la valoración cuantitativa de la expresión génica.

Las muestras se analizaron por triplicado mediante el uso del 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA) y la expresión relativa fue calculada con el software RQ manager (Applied Biosystems, USA) basándose en el método comparativo del umbral de ciclos de emisión de fluorescencia ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) y empleando como control para normalización de los datos un gen constitutivo, en este caso *GAPDH* (# 4331182 Life Technologies, España). Los resultados son representados como el cambio en la expresión en número de veces (\log_{10} -RQ) y con barras de error que comprende el rango máximo (RQmax) y el mínimo (RQmin) indicando cuál es la desviación de los datos analizados. Cada estudio incluía muestras controles que sirven como calibradores para poder referenciar los resultados encontrados. En el caso de las líneas tumorales se tomó como calibrador el fenotipo sensible, mientras que en el estudio de pacientes se utilizaron muestras no tumorales procedentes de ligaduras de trompas de Falopio, tejido que se ha descrito previamente como control en el cáncer de ovario, sustentado en la teoría de que el subtipo HGSOC tiene su origen en las fimbrias de las trompas (He et al., 2013, Karst and Drapkin, 2009) .

3.3. RNA-seq.

La extracción del ARN en las muestras procedente de tejido embebido en OCT (Optimal Cutting Temperature compound) se realizó por la misma metodología explicada en el apartado anterior. En el caso de las muestras de trompas de Falopio la extracción requirió un tratamiento mecánico previo para la homogenización del tejido, realizado a través de una pistola homogenizadora Power Biomasher II (Nippi, Japon). El ARN total correspondiente a una muestra de ovario normal (ligación tubárica) y 7 muestras tumorales fue enviado a la Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) en una concentración de 1 µg de ARN en 100 µl de agua DEPC. La tecnología de secuenciación utilizada fue la de Illumina Hiseq 2500 a través de librerías de extremos acoplados. Posteriormente, con el fin de ampliar el número de muestras para su análisis, se enviaron a Sistemas Genómicos (Valencia) 5 muestras normales de tejido de trompa de Falopio y 5 muestras tumorales (1 µg) extraídas y procesadas por los métodos ya mencionados. El protocolo seguido en Sistemas Genómicos fue el siguiente: se emplearon entre 100-200 ng de ARN y su calidad y cantidad se determinó en Bioanalyzer 2100 y Qubit 2.0. Se aisló la fracción de ARNm poli (A) + a partir del ARN total y se obtuvieron las bibliotecas de ADNc siguiendo las recomendaciones de Illumina. El ARN poli (A) + se aisló mediante perlas magnéticas unidas a oligo-poli T y se fragmentó químicamente antes de la retro-transcripción. Los fragmentos de ADNc se sometieron a un proceso de reparación final a través de la adición de una sola base "A" al extremo 3' y posteriormente se realizó la ligación de los adaptadores. Finalmente, los productos se purificaron y se enriquecieron mediante PCR para crear la biblioteca de ADNc de doble cadena final indexada. La calidad de las bibliotecas se analizó en Bioanalyzer 2100, High Sensitivity assay. La cantidad de las bibliotecas se determinó por PCR en tiempo real en LightCycler 480 (Roche). El conjunto de bibliotecas se sometió a secuenciación de final pareado (100 x 2) en el Illumina HiSeq2500. En total secuenciamos 18 muestras (6 controles y 12 tumores).

4. Determinación de la metilación del ADN.

4.1. Extracción del ADN.

Los procedimientos que se describen a continuación se refieren a la extracción del ADN de las muestras de diferentes orígenes basada en el protocolo de fenol/cloroformo, el cual se fundamenta en la separación de fases orgánicas e inorgánicas para su aislamiento (Sambrook et al., 1989).

* **Extracción de líneas celulares:** Teniendo las células congeladas en las placas se añadieron a éstas 1 ml de PBS y se rasparon para desprender las células. Se recogió el extracto de las placas congeladas y se centrifugó durante 5 minutos a 14000 RPM a 4°C. En el caso de que no estuviesen congeladas fueron tripsinizadas, centrifugadas y el precipitado celular fue recogido para la posterior extracción. El precipitado celular de los dos tipos de muestras se digirió añadiendo 200 µl de PBS 1x + EDTA 2mM, 350 µl de DNA B (NaCl 5M + EDTA 0,5 M), 40 µl de SDS y 10 µl de proteinasa K (PK 10 ug/ml) (Quiagen, USA). En este caso, la temperatura en la que se realiza la digestión fueron 50°C durante dos horas y posteriormente a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se realizó la extracción del ADN por el método de fenol/cloroformo (Merck, USA).

* **Extracción de Tejido fresco:** las muestras frescas embebidas en OCT comprendían 10 cortes de 10 µm de grosor. Se añadió a cada muestra 1 ml de PBS (libre de Ca – Mg) (Biochrom, UK) para disolver el OCT. Se centrifugaron durante 5 minutos a 14000 RPM y el sobrenadante fue retirado cuidadosamente. Se repitió el lavado y centrifugación con PBS y se procedió a la digestión y extracción. Para la extracción procedente de trompas de Falopio, estas fueron homogenizadas previamente mediante la pistola Power Biomasher II y se procedió a la extracción como se describe en el apartado anterior.

* **Extracción de bloques de parafina (FFEP):** Cada muestra comprendía 10 cortes de 10 µm de grosor. La desparafinación se realizó añadiendo un 1ml de Xileno (Panreac, Barcelona, España) a la muestra e incubando durante 5 minutos a 42°C. Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 14000 RPM y se descartó el sobrenadante. Se repitió la mezcla y centrifugación con Xileno y se añadió al precipitado 1 ml de Etanol al 100%. (Merck, USA). Se centrifugó durante 5 minutos a 14000 RPM y se retiró el etanol. Una vez la muestra estuvo completamente seca se

MATERIALES Y MÉTODOS

procedió a la digestión y extracción como se ha descrito en el apartado de extracción de líneas celulares.

4.2. Modificación del ADN por bisulfito de sodio.

El ADN extraído de los diferentes tipos de muestras fue tratado químicamente con bisulfito de sodio. La modificación química del ADN es necesaria debido a que las marcas de metilación no son preservadas durante los ciclos de amplificación. La metilación protege a las citosinas de la desaminación ocasionada por el bisulfito de sodio, que convierte en uracilos a las citosinas no metiladas y por tanto desprotegidas, gracias a la desulfonación alcalina. Los uracilos son finalmente amplificados como timinas debido a la acción de la ADN polimerasa en la amplificación posterior por PCR. Esta transformación permite diferenciar entre posiciones CpG metiladas y no metiladas.

Los pasos del tratamiento químico son: 1) Desnaturalización del ADN 2) Desaminación de la citosinas a través de la incubación con bisulfito a alta temperatura y tiempo prolongado 3) Eliminación del bisulfito por desalación 4) Desulfonación de los aductos de uracil sulfonil en un Ph alcalino y 5) Eliminación de la solución de desulfonación (Darst et al., 2010). *(Los reactivos deben ser preparados en el momento).*

En el proceso de modificación, la desnaturalización de 1 µg de ADN genómico se realizó con NaOH (0,2m/L) (Panreac Barcelona, España) durante 10 minutos a 37°C y se modificó por hidroquinona y bisulfito de sodio (Sigma Aldrich, USA) a lo largo de 16 horas a 50°C, utilizando aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra. Posteriormente el ADN modificado se purificó usando el Wizard DNAClean-Up system (Promega, USA) y se finalizó la modificación con una última incubación de NaOH (0,3m/L) (Panreac Barcelona, España) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para precipitar el ADN modificado este se incubó toda la noche con una mezcla de glucógeno 20 mg/ml (Roche, España) acetato de amonio 10 m/L (Sigma-Aldrich, España) y etanol frío al 100% (Merck, Nueva Jersey, USA). La precipitación se finalizó al día siguiente mediante centrifugaciones con etanol frío al 70%. Una vez el precipitado de ADN estuvo seco fue resuspendido en 25 µl de agua ultra pura libre de ARN asas y ADN asas (Thermofisher, USA).

MATERIALES Y MÉTODOS

4.3. Secuenciación masiva del ADN modificado por bisulfito (WGBS).

El ADN de los grupos experimentales OVCAR3 (S/R) Y A2780 (S/R) fue enviado al Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG) en Barcelona para el análisis de la metilación del genoma completo.

2µg de ADN genómico se mezclaron con ADN no metilado del fago λ en una proporción de 5 ng por cada 1 µg de ADN genómico. La librería fue preparada usando el kit de preparación de muestras TruSeq™DNA v2 (Illumina Inc) siguiendo las indicaciones de la empresa con mínimas modificaciones. El ADN fue sonificado usando un Covaris E220 (Covaris Inc, USA) para generar fragmentos de entre 50-500 pb. El tamaño seleccionado para la elaboración de las librerías fue de 150-300 pb. Estos fragmentos se purificaron a través de esferas AMPure XP (Agencourt Bioscience Corp). Posteriormente fueron reparados en sus extremos, adenilados y ligados a adaptadores específicos de extremos apareados de Illumina (Illumina Inc). Después de la ligación, los fragmentos se modificaron con bisulfito de sodio usando el EpiTect Bisulfite kit (Qiagen, USA) siguiendo las indicaciones de la empresa. El ADN modificado y ligado a los adaptadores fue amplificado en 7 ciclos de PCR usando la ADN polimerasa PfuTurboCx Hotstart (Agilent Technologies, USA). El control de calidad de la librería se realizó a través de ensayo en el BioAnalizador 7500 (Agilent Technologies, USA).

4.4. Array de metilación 450K de Illumina.

Este ensayo de metilación se realizó en 5 muestras frescas, una muestra de tejido normal de ovario y 4 muestras tumorales pertenecientes a la cohorte del Hospital Universitario de la Paz a las cuales también se secuenció el transcriptoma, como ya se ha descrito en apartados anteriores. El ADN fue extraído según los procedimientos ya mencionados y enviado al Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) para la realización del array. Se enviaron 1500 ng en un volumen de 30 µl de agua. La cantidad mínima necesaria para el desarrollo de la muestra según la tecnología Illumina es de 1000 ng. El array HumanMethylation450 BeadChip tiene una capacidad de 12 muestras e interroga más de 450.000 sitios CpG utilizando la tecnología Infinium HD Methylation. Para el análisis de estos arrays se utilizaron los paquetes minfi (Aryee et al., 2014) y ChAMP (Morris et al., 2014) los cuales permiten obtener los controles de calidad, filtrado, normalizaciones (en concreto se utilizó la normalización funcional

MATERIALES Y MÉTODOS

recomendada para comparaciones tumor / control (Fortin et al., 2014)) y obtención de posiciones diferencialmente metiladas.

Las librerías se secuenciaron en el HiSeq2000 (Illumina, Inc.) siguiendo las indicaciones del protocolo en el modo de extremos pareados con una longitud de lectura de 2x101 pb. Los análisis de imagen, la asignación de bases y la puntuación de la calidad de la carrera se procesaron con el programa “Real Time Analysis” de la casa comercial.

4.5. Secuenciación por bisulfito (SB).

En este tipo de PCR se amplifican fragmentos preferencialmente de 300 pb y no mayores de 500 pb, esto se debe a que la modificación por bisulfito es un tratamiento agresivo que ocasiona fragmentación del ADN, de hecho, alrededor de un 90% de la muestra de inicio se pierde durante la modificación (Darst et al., 2010). Esta técnica permite el análisis de la metilación alelo-específica de cada una de las citosinas en una región determinada del genoma y se fundamenta en el diseño de oligonucleótidos que no discriminan entre regiones metiladas y no metiladas. En el diseño de estos cebadores debe evitarse el incluir citosinas en el contexto CpG de su secuencia, ya que pueden presentarse sesgos relacionados con la amplificación de ADN metilado o no metilado. Si la naturaleza de la región a amplificar obliga a diseñar cebadores que incluyan dinucleótidos CpG, estos deben referenciarse como bases degeneradas cuya nomenclatura depende de la cadena de origen analizada Y (C/T en la cadena sentido) o R (A/G en la cadena antisentido). Los oligonucleótidos diseñados para los genes candidatos de estudio se muestran en la tabla 6.

Los genes con regiones diferencialmente metiladas obtenidas por WGBS en las líneas OVCAR3 (S/R) y A2780 (S/R) fueron validados por secuenciación por bisulfito y además analizados en otras líneas tumorales adicionales, con el fin de conocer la frecuencia de metilación de esas posiciones CpG. Este análisis permitió el posterior diseño de oligonucleótidos específicos para posiciones metiladas y no metiladas en la PCR de metilación específica en muestras obtenidas de pacientes, en las líneas HELA, LOVO, PC3, BT474 y A431. Como controles positivos y negativos de metilación para el desempeño de la técnica se empleó ADN de PBMCs metilados *in vitro* con metilasa Sss I (*IVD) (New England Biolabs, USA) y ADN de ovario perteneciente a pacientes con cambio de sexo respectivamente. Las condiciones de amplificación para la PCR fueron 5' a 95°, 40 ciclos → (1' a 95°C, 1' a 60 o 62° [la temperatura de

MATERIALES Y MÉTODOS

anillamiento para cada gen se obtuvo realizando una PCR de gradiente], 1' a 72 ° y una extensión final de 8' a 72°C, tabla 6.

* La metilación *in vitro* del ADN se realizó utilizando 50 µg de ADN de PBMCs, al cual se le añadieron 2,50 µl de enzima SAM 32mM (S-adenosylmethionine synthetase) (New England Biolabs, USA) más 25 µl de buffer 10x (New England Biolabs, USA), 12,5 µl de enzima Sss1 25 unidades (New England Biolabs, USA) y 60 µl de agua. Esta mezcla se incubó durante 4 horas a 37°C y posteriormente se agregaron 5 µl de SAM y 6 µl de Sss1. Se realizó otra incubación adicional de 4 horas a 37°C y se extrajo el ADN mediante fenol/cloroformo para la posterior modificación por bisulfito de este ADN metilado *in vitro*.

GEN	TEMPERATURA DE ANILLAMIENTO	TAMAÑO pb	CEBADORES
FABP5	60°C	530	S. 5'- ggggttaggttttaggtga-3' As. 5'-agcgtgttagatttgggga-3'
CFD	60°C	490	S.5'- attgaggtcggagagggga-3' As.5'- agggggatttcggtagttttt-3'
FKBP1B	62°C	399	S.5'- atggggaaggttagcggaga-3' As.5'- agatttaggttgggaagggg-3'
CDKN2D	60°C	349	S.5'- ttttcgttgcgggttattga-3' As.5'-aggaggaggagggtgagtt-3'
DCBLD2	60°C	393	S.5'- ggttggtttagtagtcgga-3' As.5'-agtcggcggtgtgagag-3'
PAX9 A1(área)	62°C	234	S.5'- aggtttttttgtttcgaagga -3' As.5'- agagggtcagtttggagaag-3'
A2(área)	60°C	415	S.5'- cgttgatttagttatttagtga-3' As.5'- agggaaatttagtggtctttat-3'
SPHK1	62°C	445	S.5'- cggttggaatcggggttaga -3' As.5'- aggttgagattcggggagtat -3'

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos para amplificación de bisulfito de los genes *FABP5*, *CFD*, *FKBP1B*, *CDKN2D*, *DCBLD2*, *PAX9* y *SPHK1*. La región de *PAX9* se dividió en dos áreas debido a su gran longitud. S: Oligo sentido, A: oligo anti sentido.

MATERIALES Y MÉTODOS

El producto amplificado por PCR se visualizó mediante su electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (Condalab, España) junto con marcadores de tamaño apropiados (100 pb, Thermofisher, Waltham, MA). Cada banda se cortó y purificó por el MinElute gel extraction kit (Qiagen, USA) para la posterior secuenciación del ADN de los genes de interés. El análisis de los amplicones se realizó mediante electroforesis capilar y secuenciación Sanger y el estudio de los correspondientes cromatogramas se realizó a través del programa Sequencher (Gene Codes Corporation).

4.6. PCR de metilación específica (MSP) y PCR de cuantificación de la metilación (qMSP).

Una vez analizadas las frecuencias de metilación de las diferentes posiciones CpG en las líneas tumorales a través de BS, se escogieron aquellas con mayor frecuencia de metilación para llevar a cabo la técnica de MSP en las diferentes cohortes de pacientes de cáncer de ovario.

- MSP: Esta técnica tiene como fundamento el diseño de cebadores de forma específica para regiones metiladas o no metiladas y es ideal para la determinación de islas CpG con bajo grado de metilación, ya que incrementando el número de posiciones CpG en el diseño aumenta la especificidad de la prueba. La sensibilidad de esta prueba es la de detectar 1 alelo metilado entre 1000 no metilados (Herman et al., 1996) y es apropiada para el análisis de ADN procedente de muestras conservadas en parafina, ya que estos amplicones tienen tamaños entre 70-100 pb, situación que es acorde al estado de fragmentación del ADN en este tipo de muestras.

Las reacciones de PCR se realizaron en los tumores primarios y en muestras control, y las condiciones de amplificación dependen de las reacciones de gradiente realizadas para cada uno de los genes, variando tanto en ciclos de repetición como en las temperaturas de anillamiento. Cada análisis se acompaña de controles cuya finalidad es la fiabilidad del resultado y el desempeño de la técnica. Como control negativo de metilación se utilizó ADN PBMCs y como control positivo de metilación el IVD. Agua sin muestra de ADN fue utilizada como control de posibles contaminaciones. La electroforesis de los productos de PCR se realizó en geles al 6% de poliacrilamida (BIORAD 19:1, USA) con marcadores apropiados de tamaño (10 pb Thermofisher, USA) y se consideró la presencia de producto de amplificación en la reacción de metilación como muestra positiva. Las condiciones de amplificación para la PCR fueron 5' a 95°, 8' a 50°C, el número de ciclos depende de cada gen → (1' a

MATERIALES Y MÉTODOS

95°C, la temperatura de anillamiento para cada gen se obtuvo realizando una PCR de gradiente de temperatura. El anillamiento tiene una duración de 1 minuto y una extensión por 1' a 72°C) y una extensión final de 8' a 72°C, tabla 7.

GEN	TEMPERATURA DE ANILLAMIENTO	TAMAÑO pb	CICLOS	CEBADORES Y SONDAS
<i>PAX9</i> Área no metilada	56°C	77	38	S. 5'- ggggtaggttttaggtga-3' As. 5'- gtatttcgagttcgggtcga -3' VIC5- TTCTACAATCCAACAACAA - MGB-NFQ
Área metilada	62°C	71	33	S. 5' attttcgtagggttcggtc -3' As. 5'- cgtatttcgagttcgggtt -3' 6FAM- TTCTACGATCCGACAACGA - MGB-NFQ
<i>FKBP1B</i> Área no metilada	56°C	84	40	S. 5'- ggcgggggttgcggttcgt -3' As. 5'- gggtattcgtgtgtgatattt -3' VIC5- TACAACCACAACAAAAA- MGB-NFQ'
Área metilada	61°C	72	31	S. 5'- ggggttgcggttcgtatc -3' As. 5'- cgttcggttattcgttgtt -3' 6FAM- TACAACCGCGACAAAAA- MGB-NFQ

Tabla 7. Secuencias de oligonucleótidos y condiciones de amplificación para PCR específica de metilación de los genes *PAX9* y *FKBP1B*. Se muestran también en esta tabla las sondas marcadas con fluoróforos diseñadas para la determinación cuantitativa de la metilación en estos genes a través de qMSP. S: Oligo sentido, A: oligo anti sentido.

- qMSP: La validación de los genes diferencialmente metilados se consolidó en las cohortes de pacientes a través de la implementación de una técnica de alto rendimiento. Esta metodología puede considerarse como una evolución de la MSP en cuanto a sensibilidad y desempeño, pues no requiere procedimientos posteriores una vez terminada la reacción e incrementa la sensibilidad de detectar un alelo metilado entre 10.000 no metilados, es decir, de un orden de magnitud mayor que la MSP (Eads et al., 2000). El ensayo está fundamentado en PCR a tiempo real basada en fluorescencia, lo que permite la cuantificación de la metilación gracias al uso simultáneo de sondas específicas de metilación y no metilación. En esta técnica usamos los cebadores empleados para MSP y diseñamos las sondas de detección

MATERIALES Y MÉTODOS

que anillan en la región comprendida entre estos oligonucleótidos, tabla 7. La aplicación de esta estrategia es menos compleja ya que puede hacerse “multiplex”, lo que significa que en un mismo pocillo pueden agregarse la sonda marcada con el fluoróforo FAM (metilación) y el fluoróforo VIC (no metilación), situación que redundará en ahorro de muestra, tiempo e incrementa el número de duplicados. Esta característica se propicia gracias al uso de una “master mix” diseñada para ensayos “multiplex”. Nosotros hemos usado el QuantiTect Multiplex PCR kit (Qiagen, Netherlands) y las sondas diseñadas por nuestro grupo sintetizadas por Applied Biosystems, USA. Las muestras quirúrgicas procedentes de los diferentes biobancos fueron evaluadas por duplicado en el 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA) y las condiciones de amplificación según recomendación de la casa comercial fueron: 2' a 50°C, 15' a 95°C y 40 ciclos (1' a 94°C, 1' a 60°C).

El cálculo directo del grado de metilación de una muestra está basado en el umbral de Ct (ciclos) determinado en cada uno de los fluoróforos:

Señal metilada:

Ct (CG) (FAM) – representa el umbral de ciclos del reportero CG (canal FAM)

Señal no metilada:

Ct (TG) (VIC) – representa el umbral de ciclos del reportero TG (canal VIC).

El porcentaje de metilación es calculado por la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de metilación} = 100/[1 + 2^{(Ct\ CG - Ct\ TG)}]\% \text{ (Eads et al., 2000)}$$

5. Herramientas bioinformáticas usadas para la validación epigenética.

Las regiones encontradas como diferencialmente metiladas por la técnica WGBS fueron identificadas como islas CpG gracias a herramientas informáticas. Estos buscadores se basan en los parámetros de Takai y Jones: GC $\geq 55\%$; Obs/Exp ≥ 65 ; y longitud ≥ 500 pb. Los buscadores utilizados fueron (<http://bioinfo.itb.cnr.it/cgi-bin/wwwcpg.pl>, http://epigenome.usc.edu/resources/software_tools/cpg_island.html). Igualmente utilizamos otra herramienta informática en la identificación de islas CpG que también utiliza los parámetros Takai y Jones. Este buscador es http://doua.prabi.fr/software/cpgprod_query cuyo software busca la identificación de promotores asociados a islas CpG en grandes regiones genómicas exhibiendo gran sensibilidad y especificidad (Ponger and Mouchiroud, 2002). Con el fin de aumentar la sensibilidad de la búsqueda, las secuencias fueron procesadas con el RepeatMasker

MATERIALES Y MÉTODOS

Web Server (<http://www.repeatmasker.org>) para eliminar el ruido experimental que pudiesen generar elementos repetitivos ALU con estructuras similares a las islas CpG (Takai and Jones, 2002, Takai and Jones, 2003). La confirmación de estas posiciones se realizó a través de los datos del proyecto ENCODE (<http://www.genome.ucsc.edu/index.html>). Otra herramienta utilizada en la identificación de islas CpG fue el explorador ENSEMBL, el cual permite también la obtención de las secuencias de dichas áreas para el posterior diseño de oligonucleótidos (<http://grch37.ensembl.org/index.html>). Esta herramienta permite el acceso a la recopilación del genoma de diferentes especies la cual organiza las diferentes fuentes de datos (Flicek et al., 2012). El análisis bioinformático aportado por el CNAG y CNIC fue complementado por Carlos Rodríguez Antolín, biólogo y bioinformático perteneciente a nuestro grupo de investigación.

6. Ensayos funcionales en líneas celulares.

Se realizó la transfección del ADNc correspondiente a los genes candidatos en las líneas celulares resistentes con el objetivo de demostrar si su sobreexpresión contribuía a la re-sensibilización al tratamiento al agente CDDP.

6.1. Transformación plasmídica de bacterias.

Se utilizaron las cepas de bacterias competentes *E. coli* DH5 α que se transformaron con 100 ng de cada plásmido. Los vectores de sobreexpresión PCMV5 llevaban en su construcción las secuencias del ADNc de los genes *PAX9* ID: RC200380 y *FKBP1B* ID: RC200667 (OrigeGene, USA). Además se utilizó como control el vector vacío PCMV5 cedido por la Dra. Rosario Perona (CIB Alberto Sols, CSIC-UAM). Bacterias y plásmidos se incubaron conjuntamente en hielo durante 30 minutos y después fueron sometidos a un choque térmico de 42°C durante dos minutos. Las bacterias transformadas se sembraron en medio líquido LB broth (Thermofisher, USA) sin kanamicina (Roth, Alemania) durante una hora a 37°C y posteriormente se sembraron en placas de medio LB agar (Sigma Aldrich, USA) + kanamicina, para permitir el crecimiento toda la noche siendo incubadas a 37°C. Al día siguiente se detuvo el crecimiento de las bacterias poniendo las placas en hielo y se repicó una pequeña muestra de colonias en 400 ml de medio LB con kanamicina (10 ng/ml). Se llevó a cabo una nueva incubación durante toda la noche a 37°C y en agitación de los matraces a 200 RPM. Al día siguiente el crecimiento se detuvo en frío

MATERIALES Y MÉTODOS

y se aplicó el protocolo QIAGEN Plasmid Purification Maxi kit catálogo 12162 (Quiagen, USA) para obtención y purificación del ADN plasmídico.

6.2. Transfección celular.

Se sembraron 3 placas p60 (500.000 células por placa) por grupo experimental para comprobar el efecto de la sobreexpresión a través de curvas de viabilidad, y también 4 placas para extraer ARN y proteínas a las 24 y 72 horas de transfección como controles de transfección, figura 3. En este experimento se utilizó la línea OVCAR3 ya que fue en esta línea donde se validó la expresión génica y epigenética de los genes en estudio.

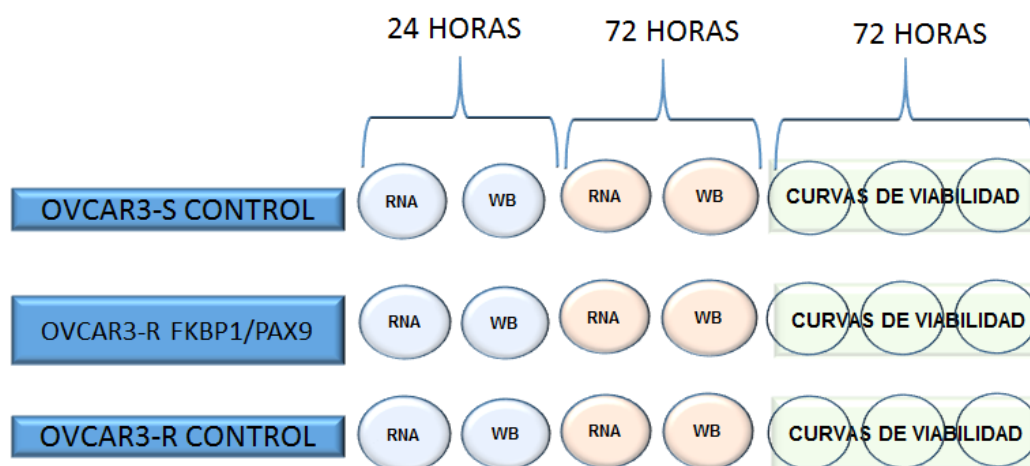


Figura 3. Esquema de transfección plasmídica. Los plásmidos de los genes *PAX9* y *FKBP1B* se transfectaron en la línea tumoral resistente OVCAR3. Para validar los resultados de las curvas de viabilidad se sembraron placas a las 24 y 72 para la extracción de ARN.

El ADN plasmídico purificado fue empleado para la transfección de las líneas celulares OVCAR3 S y R de la siguiente manera:

Para cada placa p60 se sembró una cantidad de 500.000 células en 3ml de medio RPMI (Lonza, Suiza) al 20% de SFB (Thermofisher, USA). La transfección se realizó a las 24 horas de sembradas las células, empleando 2,5 µg de plásmido por placa. Por cada microgramo de plásmido transfectado se utilizaron 2 µl del agente de transfección más NaCl 150mM. El agente de transfección utilizado fue Jet Pei (Polyplus Transfection, Graffenstaden, Francia). La mezcla de material plasmídico junto con el medio de transfección se incubó durante media hora a temperatura ambiente. Una vez terminada la incubación se añadieron 500 µl de esta mezcla a cada

MATERIALES Y MÉTODOS

grupo correspondiente y se incubaron durante 24 horas. Al día siguiente, las placas de 24 horas fueron lavadas y congeladas para la posterior extracción de ARN, mientras que las placas designadas para las curvas de viabilidad fueron tripsinizadas y sembradas en placas p24 en una densidad de 40.000 células por pocillo. A las placas de 72 horas se les puso medio completo nuevo y continuaron en incubación. Para este experimento de transfección se modificó el protocolo de las curvas de viabilidad, puesto que el tratamiento con cisplatino se realizó 6 horas después de la siembra y se incubaron durante 48 horas con el fármaco. Las concentraciones utilizadas de CDDP fueron 0, 1, 1,5, 2, 3 y 4 mg/μl. Transcurridas las 72 horas de transfección, las placas de 72 horas fueron lavadas y congeladas para la posterior extracción de ARN y a su vez se pararon las curvas de viabilidad para ser analizadas según el procedimiento ya descrito. El ARN se extrajo de los diferentes grupos experimentales para su posterior análisis por PCR cuantitativa.

7. Análisis bioinformáticos.

7.1. Diseño metodológico para la identificación de biomarcadores epigenéticos, establecimiento de matrices predictivas y análisis bioinformáticos.

El desarrollo de este trabajo tiene como finalidad el logro de dos grandes objetivos y por tanto las estrategias metodológicas empleadas para alcanzar cada uno de ellos son diferentes. El primer diseño experimental está basado en la identificación a corto plazo de marcadores epigenéticos de resistencia a tratamiento con sales de platino. La búsqueda de estos biomarcadores se apoyó en modelos celulares en los que se analizaron sus perfiles de expresión génica y metilación diferencial, a través de microarrays de expresión y WGBS respectivamente. Los resultados de la secuenciación masiva del genoma de estas líneas tumorales fueron respaldados a través de la secuenciación Sanger. Esta estrategia de validación propició el refinamiento de los métodos de análisis de metilación, como es el valor β . El valor β permite determinar diferencias en la metilación de las muestras estudiadas, ya sean fenotipos celulares resistentes versus sensibles o tejido tumoral versus tejido normal. La disponibilidad de la información de pacientes de cáncer de ovario en bases de dominio público permitió la conjunción de posibles candidatos *in silico* con aquellos identificados en el modelo *in vitro*. Los resultados de esta unión de fueron evaluados a nivel celular y también a nivel traslacional, con el fin de validar el papel de estos genes

MATERIALES Y MÉTODOS

como marcadores de resistencia. La descripción general de este primer diseño se muestra en la figura 4.

El segundo gran objetivo de este trabajo fue sentar las bases para el desarrollo de una futura matriz bioinformática de predicción de respuesta a tratamiento en pacientes afectados por el cáncer de ovario. Las bases de estas matrices predictivas son las metodologías de cribado masivo, que en nuestro caso están enfocadas a nivel génico (expresión génica) como epigenético (análisis de metilación). Este segundo diseño experimental se caracterizó por la introducción de metodologías como RNA-seq y el array de metilación 450K, figura 5. También formaron parte de este diseño la implementación de nuevos criterios para la inclusión de pacientes de las bases de datos, así como cambios en los parámetros de análisis de metilación y zonas de interrogación de posiciones CpG diferencialmente metiladas. Sumado a las nuevas estrategias empleadas en este diseño experimental, los resultados finales de genes candidatos provienen también del análisis conjunto de los resultados hallados en nuestro modelo experimental *in vitro* figura 4b, como hizo parte también del diseño utilizado para el primer objetivo.

La combinación de estos elementos metodológicos permitió la implementación de diferentes aproximaciones para el cumplimiento de los objetivos propuestos, con un aspecto en común, como lo fueron los datos de WGBS y de microarrays de expresión génica de nuestras líneas tumorales establecidas.

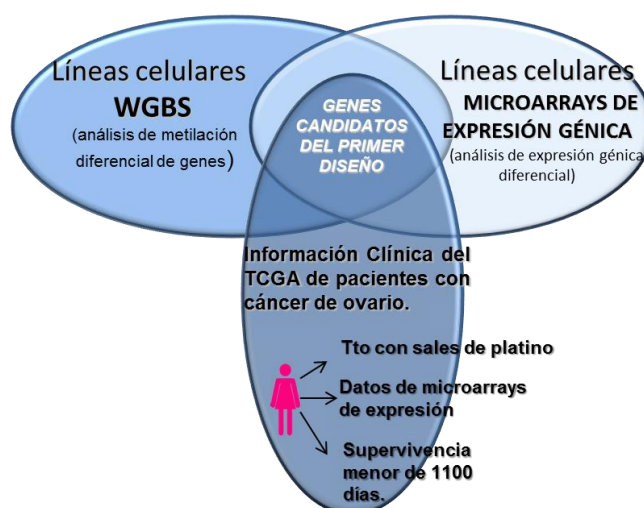


Figura 4. Primer diseño metodológico. A través del desarrollo del trabajo se implementaron dos abordajes experimentales que tienen como base los datos obtenidos de WGBS y microarrays de expresión. Los candidatos obtenidos en el primer diseño consisten en aquellos genes diferencialmente metilados y con expresión disminuida hallados de manera común en las líneas tumorales de ovario como en los pacientes seleccionados del TCGA.

MATERIALES Y MÉTODOS

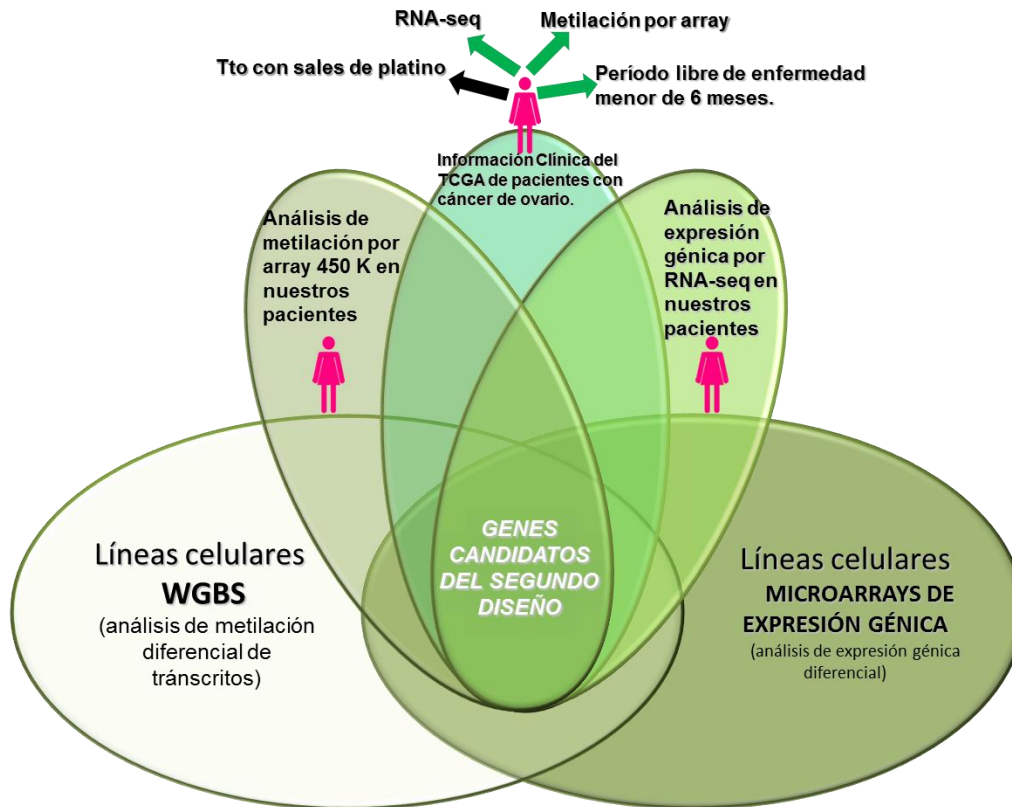


Figura 5. Segundo diseño metodológico En el segundo abordaje se incluyeron las técnicas de análisis masivo de metilación y expresión génica, correspondientes a arrays de metilación 450K y RNA-seq realizados a muestras de nuestros pacientes. De esta manera se pudo interpolar la información obtenida del TCGA de pacientes que contaban con datos de arrays de metilación y RNA-seq y que para este diseño tuviesen un periodo libre de enfermedad menor de 6 meses, siendo así considerados resistentes al tratamiento con platino. Los genes obtenidos en este diseño corresponden al análisis conjunto de las metodologías ya mencionadas junto con los resultados de metilación por WGBS, que en este caso corresponden a transcritos diferencialmente metilados, contrastados con genes inhibidos en resistencia obtenidos de los microrrays de expresión.

7.2. Selección de pacientes candidatos a partir de la base de datos del TCGA.

Haciendo uso de la disponibilidad pública en el TCGA de información tanto clínica como genómica, procedimos a la descarga de datos de pacientes con cáncer de ovario que cumpliesen con ciertos criterios de inclusión. Debido a que nuestra búsqueda de candidatos está estructurada en dos modelos experimentales, cada uno de ellos se caracteriza por la implementación de un análisis u otro. De este modo el uso de las bases de datos en el primer modelo se basó en la recopilación de la información de aquellos pacientes que hubiesen sido tratados con sales de platino, contaran con datos de expresión génica, específicamente microarrays de expresión tanto para tumor como para muestra control de tejido adyacente y una supervivencia menor de 1100 días. Este generoso rango de supervivencia fue empleado con el

MATERIALES Y MÉTODOS

objetivo de contar con un tamaño de muestra que permitiera realizar nuestro análisis preliminar ya que de lo contrario el número de pacientes utilizado habría sido muy bajo. Para el segundo abordaje los parámetros de selección fueron más restrictivos en el sentido que al menos una de las muestras del paciente debía haber sido analizada a nivel de expresión génica y metilación. Aunque estas condiciones restringen el número de pacientes disponibles, a la vez favorece el aumento de la especificidad necesaria en las matrices predictivas. El método de expresión génica en este caso correspondió a pacientes con datos de RNA-seq, mientras que para la metilación se basó en arrays de metilación. El factor crítico en esta segunda aproximación fue la disponibilidad de información clínica completa que permitiera determinar con seguridad el fenotipo resistente o sensible al tratamiento. En este abordaje el parámetro discriminativo utilizado fue el periodo libre de enfermedad, el cual establece que si un paciente tarda menos de 6 meses en recaer una vez terminado el tratamiento será considerado como resistente. Esta nueva inclusión propició la disminución significativa de los pacientes a estudiar. Se recopiló la información de las bases de datos y una vez descargada se diseñaron diversos programas en el lenguaje de programación Perl que permite organizar la información para introducirla posteriormente en bases de datos PostgreSQL. PostgreSQL es un sistema gestor de base de datos (SGBD) conformado por un conjunto de programas que permiten el almacenamiento, modificación y extracción de la información, además de proporcionar herramientas para añadir, borrar, modificar y analizar los datos.

- Análisis de metilación y expresión.

La determinación de la metilación diferencial en las diferentes tecnologías empleadas para el análisis de la metilación (WGBS, arrays) se basó en la implementación de paquetes estadísticos de análisis de metilación así como de un método ya empleado en la discriminación de los niveles de metilación en los microarrays de Illumina, conocido como valor β . Este valor está basado en el número de veces que una citosina es secuenciada como citosina en el contexto CG (lectura de metilación), o una timina es secuenciada como timina en el contexto TG (lectura de no metilación) tras la implementación de una fórmula matemática (Weisenberger et al., 2008) figura 6. Para la identificación de regiones diferencialmente metiladas de interés, los datos obtenidos de WGBS se analizaron con los parámetros β y si pasaban el filtro establecido eran contrastados a través de MethyKit para tener certeza de su significancia estadística. MethyKit es un paquete del programa estadístico R, el cual permite analizar la información de metilación de secuenciación del alto rendimiento (Akalin et al., 2012). Los datos de metilación de los pacientes del TCGA provienen de

MATERIALES Y MÉTODOS

estudios llevados a cabo con el array de metilación 27K de Illumina. El proceso de análisis fue llevado de la misma forma que con los 450K explicados anteriormente, partiendo de los valores beta obtenidos en el TCGA.


$$\beta = \frac{\text{Lecturas M}}{\text{Lecturas U} + \text{Lecturas M}}$$
A vertical color scale bar representing the range of beta values from 0 to 1. The scale is marked with values 0, 0.25, 0.5, 0.75, and 1. The color transitions from blue at 0, through green and yellow, to red at 1.

Figura 6. Valor β . El valor beta está definido como el cociente entre el número de lecturas metiladas y la suma de lecturas no metiladas y metiladas. El valor β se traduce a un número comprendido entre 0 y 1 o 0 y 100%. Bajo condiciones ideales, un valor cero indica que todas las copias de una citosina específica en la muestra se encuentran completamente sin metilar (ninguna lectura metilada fue detectada), y un valor de uno indica que cada copia de esa posición se encuentra metilada.

Respecto a los análisis bioinformáticos de expresión, las lecturas del RNA-seq fueron procesadas a través de flujo de trabajo basado en FastQC para asegurar la calidad de las lecturas, y a través de Cutadapt v1.3 (Martin, 2011) para eliminar remanentes de los adaptadores de Illumina y descartar secuencias que fueran más cortas de 30 pb. Las lecturas fueron analizadas mediante la metodología de cuantificación de genes e isoformas RSEM v1.2.3 (RNA-Seq by Expectation Maximization) (Li and Dewey, 2011). A través de este programa se obtuvo el recuento de lecturas a nivel de genes y transcritos anotadas en la versión hg19. Con esta información se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial con edgeR (McCarthy et al., 2012) para obtener los genes/transcritos diferencialmente expresados en tejido tumoral frente a normal ($FDR < 0,05$). Se descartaron aquellos genes/transcritos que tuvieran menos de 1 lectura por millón en menos de 6 muestras. La normalización se realizó a través del método TMM (Trimmed mean of M-values) (Robinson and Oshlack, 2010) y el modelo utilizado fue QLF teniendo en cuenta la variabilidad técnica asociada a la existencia de muestras secuenciadas en distintos centros y tiempos.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Establecimiento de líneas tumorales humanas de cáncer de ovario resistentes a sales de platino.

Para lograr la identificación de biomarcadores epigenéticos establecimos un modelo de resistencia *in vitro*. Las líneas resistentes a cisplatino fueron seleccionadas después de una exposición final a 0,5 y 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de CDDP para A2780-R y OVCAR3-R respectivamente, mostrando una resistencia 2 veces mayor a sus correspondientes parentales e índices de resistencia de 2,2 ($p<0,001$) y 2,3 ($p<0,001$), respectivamente, figura 7 a y b y tabla 8. De igual manera se establecieron líneas resistentes a carboplatino, seleccionando fenotipos finales con una resistencia de 0,3 y 0,7 $\mu\text{g/ml}$ de CBDCA para OVCAR3-R y A2780-R e índices de resistencia de 3,75 ($p<0,05$) y 2,5 ($p<0,001$) respectivamente, figura 7 c y d y tabla 8.

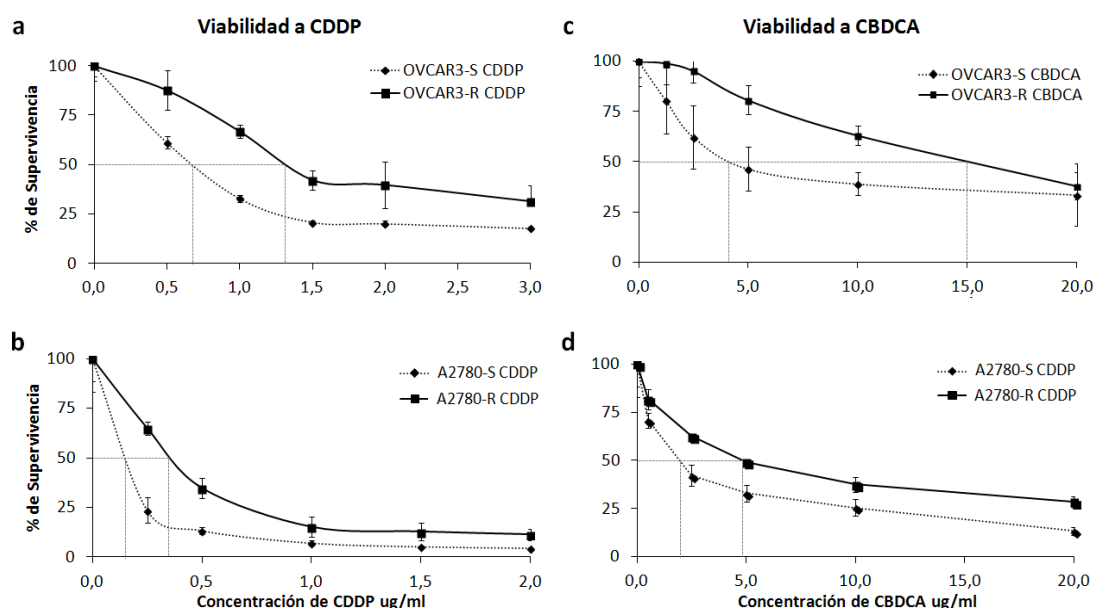


Figura 7. Establecimiento de fenotipos resistentes. Los datos se normalizaron respecto al control no tratado (100% de supervivencia) y se muestran como la media de la desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado para cada concentración del fármaco. El IC 50 es la concentración inhibitoria en la cual mueren el 50% de las células. a) OVCAR3 resistente a CDDP b) A2780 resistente a CDDP c) OVCAR3 resistente a CBDCA d) A2780 resistente a CBDCA.

La actividad cruzada de los dos fármacos mostró diferencias significativas en la viabilidad celular entre los fenotipos sensibles y resistentes. La línea tumoral OVCAR3 resistente a CDDP mostró un índice de resistencia a CBDCA casi 6 veces más que su compañera sensible, figura 8a y tabla 8, mientras que la línea A2780 resistente a CDDP tuvo una resistencia casi tres veces mayor a CBDCA respecto a A2780-S, figura 8b y tabla 8. Las líneas tumorales resistentes *per se* a CBDCA también

RESULTADOS

mostraron diferencias significativas en la viabilidad celular cuando fueron expuestas a CDDP. La línea OVCAR3 resistente a CBDCA exhibió un índice de resistencia de 2,2 hacia CDDP respecto de su compañera sensible, figura 8c y tabla 8. El menor grado de resistencia pertenece a la línea tumoral A2780 resistente a CBDCA ya que su índice de resistencia hacia CDDP fue de 1,1 respecto a su compañera parental, figura 8d y tabla 8. Al comparar los índices de resistencia entre las líneas OVCAR3 resistente a CDDP expuesta a CBDCA (5,75 $p < 0,001$ tabla 8) y OVCAR3 resistente a CBDCA expuesta a CDDP (2,2 $p < 0,05$ tabla 8), se obtuvo una resistencia 2,6 veces mayor hacia el tratamiento con carboplatino. Este mismo análisis en la línea tumoral A2780 muestra una resistencia de 2,4 veces, prácticamente el mismo grado de resistencia hacia CBDCA que el observado en OVCAR3.

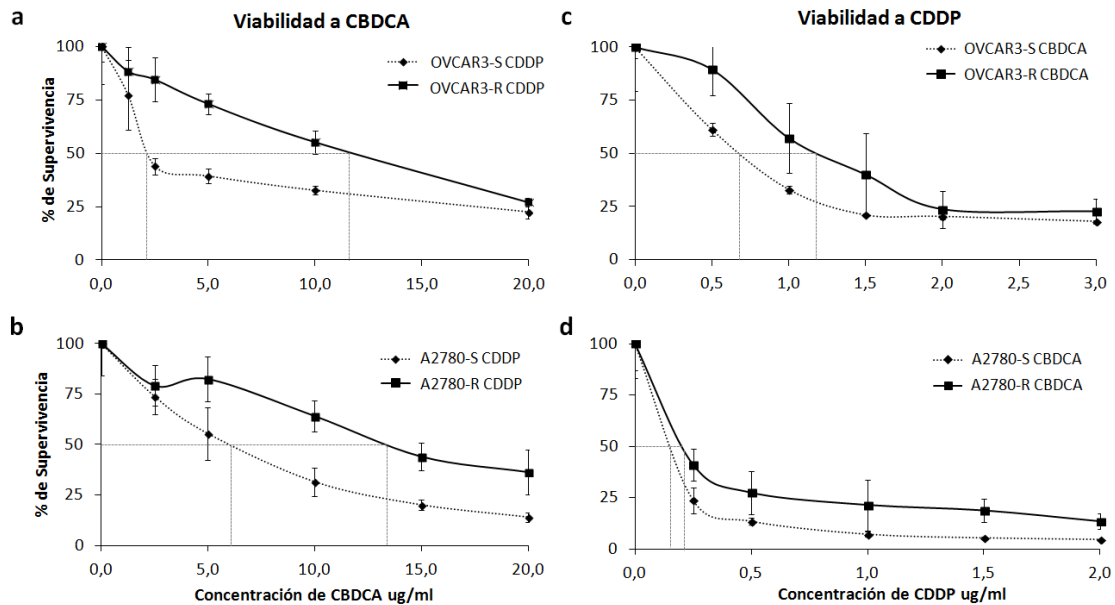


Figura 8. Resistencia cruzada en líneas tumorales de ovario. Para evidenciar la actividad cruzada de las sales de platino, las líneas celulares tumorales de ovario resistentes a cisplatino fueron tratadas con carboplatino y a su vez las resistentes a carboplatino se trataron con cisplatino.

RESULTADOS

LINEA CELULAR	IC 50 CDDP (ug/ml) \pm SD	IR CDDP	P-valor	IC 50 CBDCA (ug/ml) \pm SD	IR CBDCA	P-valor
OVCAR3 S CDDP	0,60 \pm 0,5	-	-	2 \pm 0,04	-	-
OVCAR3 R CDDP	1,3 \pm 0,14	2,2	< 0,001	11,5 \pm 0,07	5,75	< 0,001
A2780 S CDDP	0,15 \pm 0,08	-	--	6 \pm 0,31	-	-
A2780 R CDDP	0,35 \pm 0,04	2,3	< 0,001	13,5 \pm 0,14	2,2	< 0,05
OVCAR3 S CBDCA	0,6 \pm 0,17	-	-	4 \pm 0,1	-	-
OVCAR3 R CBDCA	1,3 \pm 0,21	2,2	< 0,001	15 \pm 0,05	3,75	< 0,05
A2780 S CBDCA	0,18 \pm 0,14	-	-	2 \pm 0,02	-	-
A2780 R CBDCA	0,2 \pm 0,16	1,1	< 0,05	5 \pm 0,01	2,5	< 0,001

Tabla 8. Representación del IR. En esta tabla se describen los índices de resistencia de cada línea tumoral respecto al tratamiento al que fueron expuestas, todos ellos con significación estadística que evidencia la acción cruzada de las sales de platino utilizadas en el tratamiento de cáncer de ovario. El índice de resistencia fue calculado como IC 50 de resistentes / IC50 de sensibles. D.E: desviación estándar. P<0,001 y P < 0,05 fue considerada como un cambio estadístico significativo en la sensibilidad al fármaco (T de Student's)

2. Expresión génica diferencial entre los fenotipos tumorales como efecto del tratamiento con platino.

El uso del paquete estadístico "Limma" (Smyth, 2005) permitió identificar un amplio número de genes diferencialmente expresados en las líneas tumorales OVCAR3 y A2780, todos ellos con valores de un p-valor ajustado o FDR menor de 0,05. El FDR (False Discovery Rate) es un valor estadístico empleado cuando se presentan múltiples hipótesis que permite disminuir la posibilidad de error en los eventos identificados como significativos. Los contrastes de los microarrays de expresión representados en la figura 9 permitieron identificar el número de genes sobre-expresados o inhibidos de acuerdo al estado de respuesta farmacológica así como del tipo de línea celular. De manera global, los resultados de los microarrays de expresión permitieron identificar 9.736 genes expresados diferencialmente en las dos líneas tumorales de cáncer de ovario, figura 9.

RESULTADOS

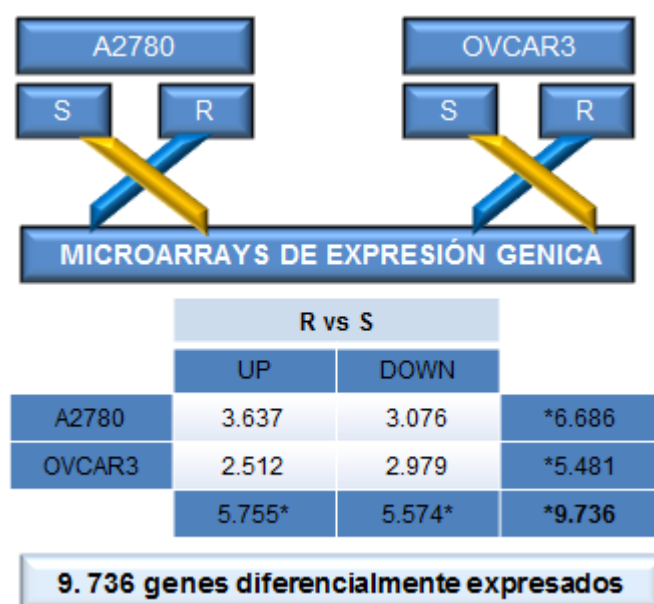


Figura 9. Perfil de expresión génica asociado al tratamiento con CDDP. La tabla muestra el número de genes diferencialmente expresados para cada línea celular en los contrastes R vs S (p-valor ajustado $\leq 0,05$). La barra azul representa el contraste de sobreexpresión en resistencia (UP) y la barra naranja el contraste de inhibición (DOWN). Se identificaron 3.637 y 2.512 genes sobreexpresados en resistencia para A2780 y OVCAR3-R respectivamente. Se hallaron 3.076 genes inhibidos en resistencia para A2780 y 2.976 para OVCAR3-R. El análisis conjunto por tipo celular condujo a obtener un número de 6.686 genes expresados diferencialmente para A2780 y 5.481 en OVCAR3. * El sumatorio de cada análisis no tiene una equivalencia matemática ya que se han eliminado las sondas que hibridaron por duplicado para un mismo gen.

3. Características técnicas de la secuenciación del metiloma en líneas tumorales de ovario sensibles y resistentes a cisplatino.

El “Roadmap Epigenomics Project” del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos recomienda una cobertura de 30x en la secuenciación masiva del metiloma cuando se secuencian replicados biológicos (Ziller et al., 2015).

A través del sumatorio de cada uno de los porcentajes parciales correspondientes a los rangos de coberturas, se obtuvo el porcentaje de nucleótidos cubiertos para cada línea tumoral: un 97,7% de cobertura para A2780-S, 97,7% para A2780-R, 94,1 % para OVCAR3-S y 95,3% para OVCAR3-R. En la figura 10 se detalla el porcentaje de cobertura con una profundidad de entre 10X y 30X para cada línea tumoral. Estos porcentajes proceden del sumatorio de porcentajes parciales dentro del rango Log10 (1,0-1,5). En términos generales se observa que alrededor de la mitad de posiciones CpG secuenciadas para todas las líneas tumorales tuvieron una cobertura entre 10X y 30X, rangos recomendados en el estudio del metiloma.

RESULTADOS

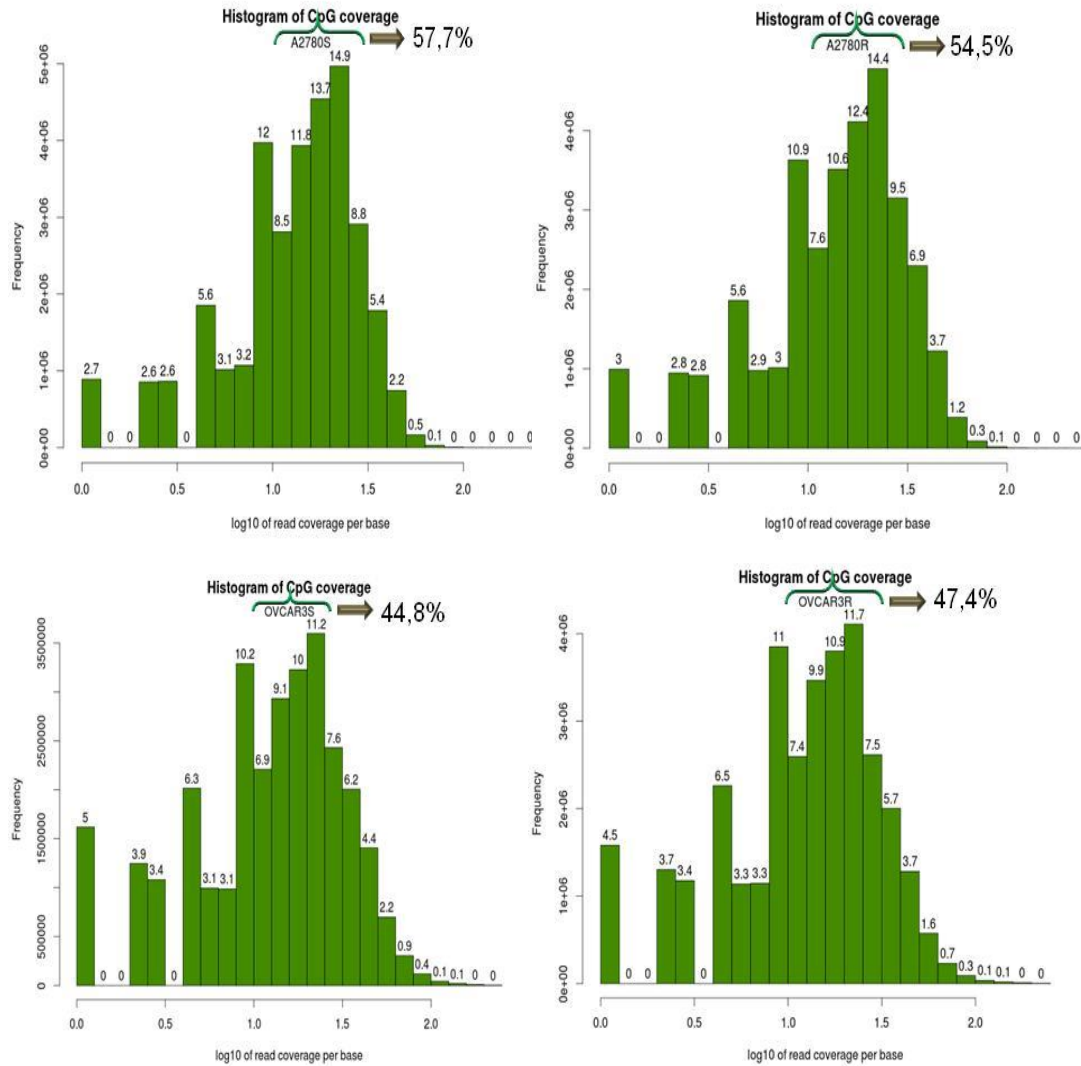


Figura 10. Histogramas de cobertura. Los porcentajes de cobertura entre el 10X al 30X en cada uno de los fenotipos fueron 57,7% para A2780-S, 54,5% para A2780-R, 44,8% para OVCAR3-S y 47,4% para OVCAR-R. En el eje X se representa el Log10 de cobertura y en el eje Y la frecuencia por millones.

Respecto al estado del metiloma, se observa una elevada frecuencia de metilación en todas las líneas pues el porcentaje más alto corresponde a las posiciones CpG metiladas en su totalidad (100%). La distribución de estas posiciones metiladas en un 100% para cada fenotipo fue la siguiente: A2780-S con 43%, A2780-R con 43%, OVCAR3-S con 54,4% y OVCAR3-R con 59%, figura 11.

RESULTADOS

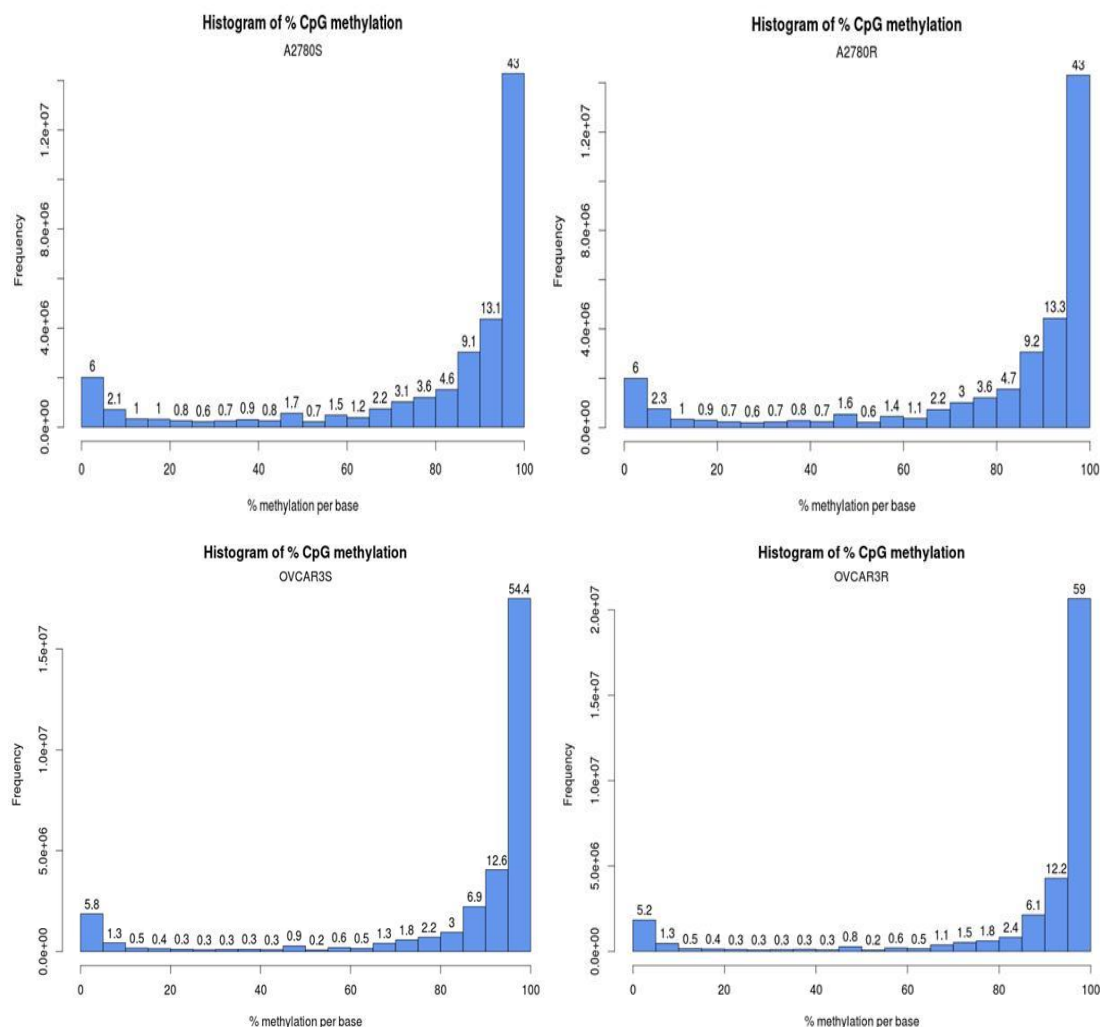


Figura 11. Histogramas de metilación. Las dinucleótidos CpG secuenciados mostraron diferentes grados de metilación hasta alcanzar un número significativo de citosinas que llegan al 100% de metilación. El eje X corresponde al porcentaje de metilación por base mientras que en el eje Y se representa la frecuencia por millones.

4. Búsqueda de biomarcadores epigenéticos en resistencia a sales de platino: Objetivo 1.

El primer objetivo de este trabajo fue la identificación a corto plazo de genes candidatos cuya inhibición de su expresión medie la resistencia al tratamiento con platinos, con el fin de predecir a nivel traslacional la respuesta de pacientes que exhiban un perfil biológico similar.

RESULTADOS

descritos en trabajos previos (Molaro et al., 2011). El gen *SPHK1* tiene rango 1 y sus diferencias de metilación entre R y S son altas (delta beta ~0,2). Los genes *DCBLD2* y *CDKN2D* sin embargo, son genes con un rango 4 de metilación, por lo que la diferencia de metilación entre R y S es menor. Se hizo una validación inicial en estos tres genes con el fin de validar que los parámetros β seleccionados eran correctos para establecer su uso como parámetro de selección de candidatos en este trabajo.

GEN	METILACIÓN RvsS	UBICACIÓN	LÍNEA CELULAR	COORDENADAS REGIÓN VISTA EN WGBS	LONGITUD	POSICIONES DIFERENCIALMENTE METILADAS EN WGBS
<i>SPHK1</i>	1	BETA	A2780	Chr17 – 74378692 – 74378907	215	6
<i>DCBLD2</i>	4	ALFA	OVCAR3	Chr3 – 98620491 – 98620596	426	18
<i>CDKN2D</i>	4	ALFA	OVCAR3	Chr19 – 10679768 – 10679840	72	8

Tabla 9. Primeros genes validados seleccionados a través de valores β R > 0.7 y S < 0.3

En el gen *SPHK1* se hallaron niveles de metilación similares en ADN procedente tanto de células sensibles como resistentes en la línea tumoral de ovario analizada y fue considerado como un control positivo de metilación para ambas situaciones S y R. Por el contrario, los genes *DCBLD* y *CDKN2D* no presentaban ningún grado de metilación en las líneas tumorales sensibles y resistentes de OVCAR3, por lo que se consideran controles negativos de metilación para ambas situaciones, figura 13.

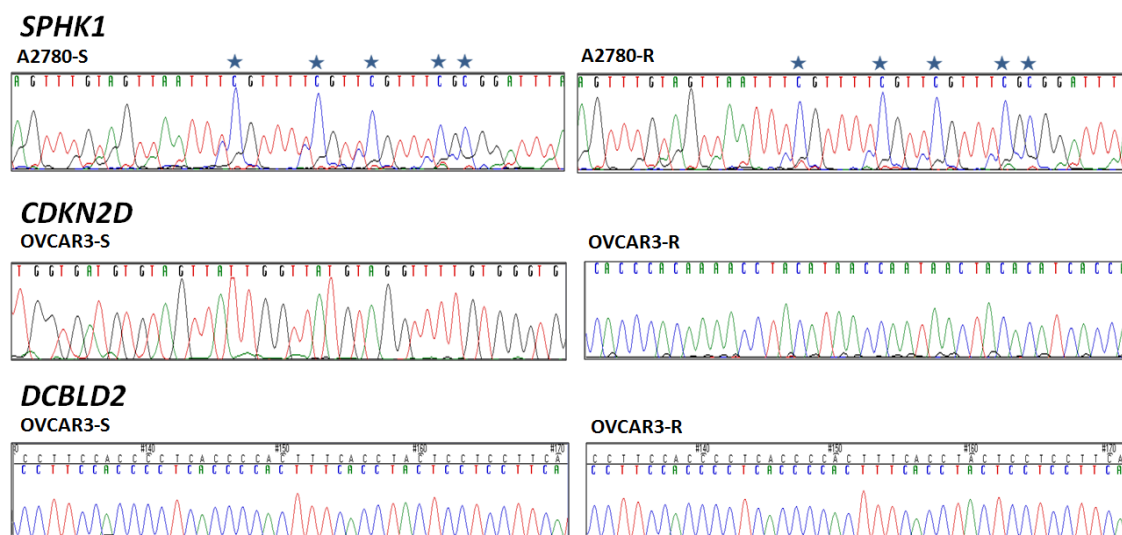


Figura 13. Secuenciación por bisulfito de los genes *SPHK1*, *CDKN2D* y *DCBLD*. Representación de fragmentos de secuencia del área de los genes de ADN modificado por bisulfito procedente de las líneas tumorales sensibles y resistentes OVCAR3 y A2780. El gen *SPHK1* fue secuenciado con el cebador sentido. *CDKN2D* y *DCBLD* fueron secuenciados con el cebador antisentido excepto para la línea OVCAR3-S en *CDKN2D*.

RESULTADOS

Estos resultados permitieron ajustar los valores de metilación utilizados en esta aproximación bioinformática, considerándose agregar otro rango menor de 0,2 en S y con una diferencia mayor de 0,4 en R; con el fin de intentar evitar posiciones metiladas en R que ya presentaban metilación basal en S. Sin embargo, este ajuste implicó bajar el valor de R para no perder candidatos cuya metilación sea moderada en R. Esto conlleva a la posibilidad de seguir encontrando posiciones no metiladas en el ADN procedente de celular resistentes, por lo cual es fundamental la validación de los parámetros.

El análisis basado en los nuevos criterios bioinformáticos y el filtrado 5X aplicado para el objetivo 1 condujo a la identificación de 298.152 y 178.113 posiciones CpGs diferencialmente metiladas en A2780-R frente a A2780-S y OVCAR3-R frente a OVCAR3-S respectivamente, las cuales englobaron 4.097 genes, figura 14. La interrogación de las posibles regiones diferencialmente metiladas se enfocó en tres tipos de áreas genómicas denominadas Alfa, Beta y Gamma. Denominamos Alfa a aquellas regiones típicas promotoras cercanas al sitio del inicio de la transcripción TSS (Transcriptional Start Site); las regiones Beta son áreas distantes en dirección 5' a más de 2 kb y 4kb del inicio de islas CpG conocidas como “shores” y “shelves” respectivamente; y las regiones Gamma son aquellas ubicadas dentro del cuerpo del gen. A parte de las diferentes regiones interrogadas, los nuevos candidatos fueron caracterizados también en base al grado de metilación diferencial observado entre los fenotipos. En las tablas 1, 2 y 3 del Anexo I, se representan los genes agrupados según la región interrogada y en ellas se muestra también el grado de metilación.

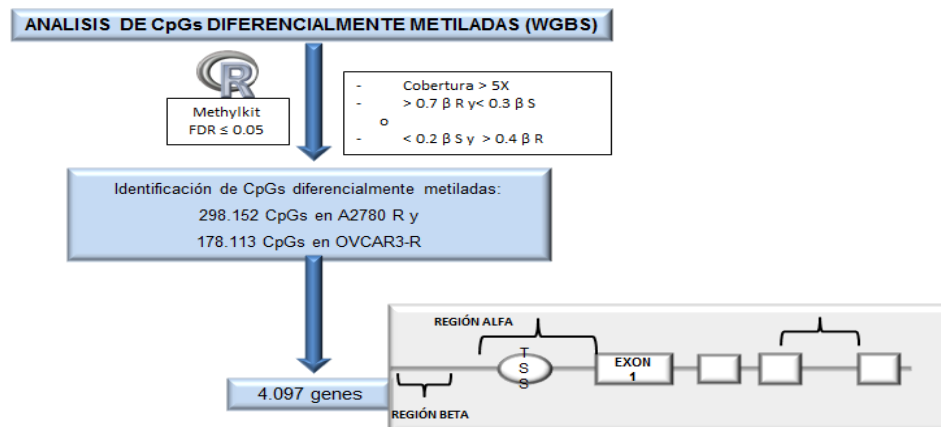


Figura 14. Identificación de posiciones CpG diferencialmente metiladas en resistencia vs sensibilidad en las líneas tumorales de ovario en el primer diseño experimental. El análisis bioinformático del metiloma empleó un FDR menor de 0,05. La implementación de nuevos valores β en lecturas con cobertura mayor de 5X permitió identificar posiciones metiladas de forma diferencial en los fenotipos resistentes. Estas posiciones metiladas fueron interrogadas en diferentes áreas genómicas como se ilustra en la figura.

RESULTADOS

4.3. Criterios para la selección de pacientes de la base de datos TCGA que participan en el estudio de la búsqueda de biomarcadores epigenéticos en resistencia.

La búsqueda de genes candidatos predictores de resistencia en CEO está basada en la identificación de GST cuyo silenciamiento epigenético esté asociado a resistencia al tratamiento con cisplatino. Para tal fin se combinaron los resultados obtenidos de los modelos experimentales *in vitro* junto con bases de datos de dominio público que recopilan información tanto clínica como experimental de pacientes con cáncer. Este diseño establece un paralelismo con los hallazgos en el área básica y permite la identificación de candidatos apoyados en los datos clínicos. Las bases de datos utilizadas (TCGA) aportan información relacionada con el tipo de tumor, clase de tratamiento y seguimiento clínico de los pacientes. Basados en esta información seleccionamos 576 pacientes con cáncer de ovario para el desarrollo del primer objetivo. De estos 576 pacientes, 238 contaban con los requisitos para ser parte del análisis. Estos requisitos consistían en que fuesen tratados con platinos, hubiesen fallecido antes de 1.100 días y que tuvieran datos de expresión génica en muestra control como tumoral. De estos 238 pacientes, 123 fallecieron en el rango establecido para ser considerados como pacientes con peor respuesta al tratamiento.

4.4. Combinación de datos experimentales con los datos de dominio público como estrategia de selección génica para la identificación de biomarcadores epigenéticos implicados en la aparición de resistencia.

Esta primera aproximación se origina de la combinación entre los perfiles de expresión diferencial en el modelo experimental y los pacientes seleccionados del TCGA. A partir de este análisis preliminar se hallaron 7.377 genes comunes diferencialmente expresados entre las líneas tumorales y los pacientes, de los cuales 153 eran comunes para los 123 pacientes seleccionados, figura 15. Con el fin de identificar candidatos bajo regulación epigenética, este grupo de genes fue contrastado con los microarrays de expresión del fenotipo RT, identificando 91 genes que se re-expresan por acción del tratamiento con fármacos epigenéticos, figura 15. Mediante herramientas informáticas se interrogó la presencia de islas CpG en estos 91 genes, encontrando islas para 66 genes, figura 15. A través del contraste de estos 66 candidatos con el grupo de 4.097 genes identificados como diferencialmente metilados por WGBS, se encontró un conjunto de 29 genes con metilación diferencial en resistencia versus sensibilidad. En las tablas 1, 2 y 3 del Anexo I se representan los

RESULTADOS

genes agrupados según la región interrogada y el grado de metilación identificado por WGBS. Se realizó un cribado de este grupo de genes basado en la ubicación genómica de las áreas metiladas, el grado de metilación y el número de posiciones CpG que exhibían. De este modo se seleccionaron 4 genes, *FABP5*, *CFD*, *PAX9* y *FKBP1B* para su posterior validación.

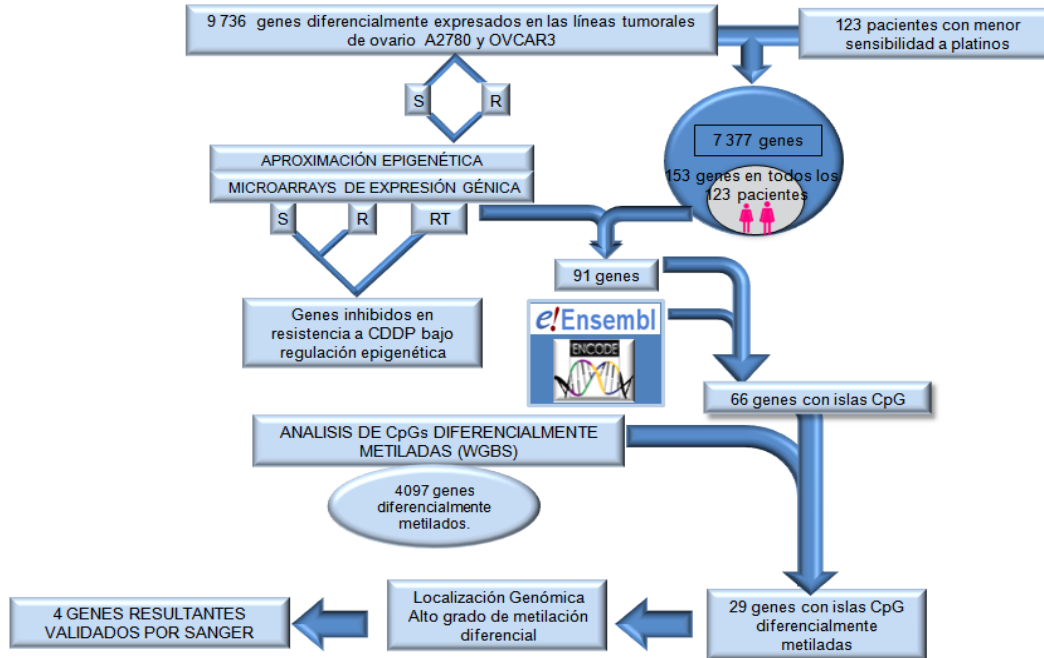


Figura 15. Identificación de genes candidatos en el primer objetivo. A través de un análisis conjunto de expresión génica diferencial *in vitro* e *in silico* se obtuvo un grupo de genes comunes diferencialmente expresados en todos los pacientes. A través del análisis de WGBS en el modelo experimental celular, estos genes se fueron identificados como diferencialmente metilados en resistencia.

4.5. Validación de la presencia de metilación en los candidatos seleccionados.

El criterio seguido para la selección génica se basó en la ubicación de la región diferencialmente metilada, la intensidad de la metilación detectada en esta área y el número de posiciones CpG diferencialmente metiladas. Es importante tener en cuenta que el número de posiciones metiladas no tiene una relación directa con el grado de metilación diferencial, por lo que para la selección de candidatos se escogieron aquellos con mayor grado de metilación y mayor número de posiciones CpG metiladas. Los genes *FABP5*, *PAX9* y *FKBP1B* se escogieron entre los 29 candidatos por seguir estos criterios en los tres grupos alfa, beta y gamma respectivamente. También se seleccionó el gen *CFD*, que presenta un área metilada en cada línea celular. Dentro de los genes muy diferencialmente metilados o nivel 1, después de *PAX9*, el área de *CFD* identificada en la línea OVCAR3, es quien mayor número de

RESULTADOS

posiciones metiladas exhibe. Dentro del grupo 2 o diferencialmente metilado, la región de *CFD* identificada en la línea A2780 es la que más posiciones CpG exhibe.

FAPB5: La secuenciación de este gen en el ADN procedente de las líneas A2780-S y A2780-R no permitió obtener cromatogramas claros que identificasen diferencias de metilación entre ambas líneas tumorales, aunque se intentó en repetidas ocasiones. En los cromatogramas se observa un fondo de guaninas (citosinas en sentido), que indicaría una posible hemi-metilación en ambas líneas, con un nivel de intensidad similar, figura 16, lo que indicaría una ausencia de validación epigenética para este candidato. En el ADN procedente de tejido no tumoral de ovario y de PBMCs no se detectan posiciones CpG metiladas.

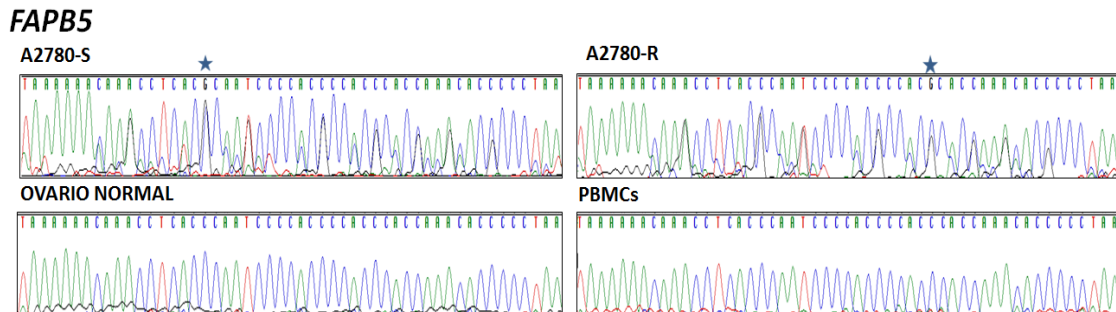


Figura 16. Secuenciación por bisulfito del gen *FAPB5*. Representación de un fragmento de secuencia del área del gen *FAPB5* de ADN modificado por bisulfito procedente de las líneas tumorales sensibles y resistentes A2780, tejido normal de ovario procedente de pacientes sometidas a cambio de sexo y ADN procedente de Células Mononucleadas de Sangre Periférica (PBMC's). Todas las muestras fueron secuenciadas con el cebador antisentido. Las posiciones metiladas se indican con un asterisco azul.

CFD: El gen *CFD* mostró dos áreas diferencialmente metiladas por WGBS, las cuales fueron denominadas área 1 (diferencialmente metilada en A2780) y área 2 (diferencialmente metilada en OVCAR3), tal y como muestra la tabla 2, Anexo I. De la validación de este gen para el área 1 se obtuvieron resultados inesperados debido a que no se observó metilación en el fenotipo A2780-R pero sí en el ADN no tumoral procedente de diferentes fuentes como como saliva, ovario normal y PBMCs, además de las líneas tumorales HeLa y LoVo, figura 17. Sin embargo, en el área 2, sí que se valida la identificación realizada con los valores β seleccionados en la línea OVCAR3, aunque se observan sólo dos posiciones hemimetiladas en R. Sin embargo, al igual que en el análisis realizado en A2780, se observa una clara metilación el ADN de origen no tumoral así como en las líneas tumorales HeLa y LoVo, figura 18.

RESULTADOS

CFD

A2780-S

A2780-R

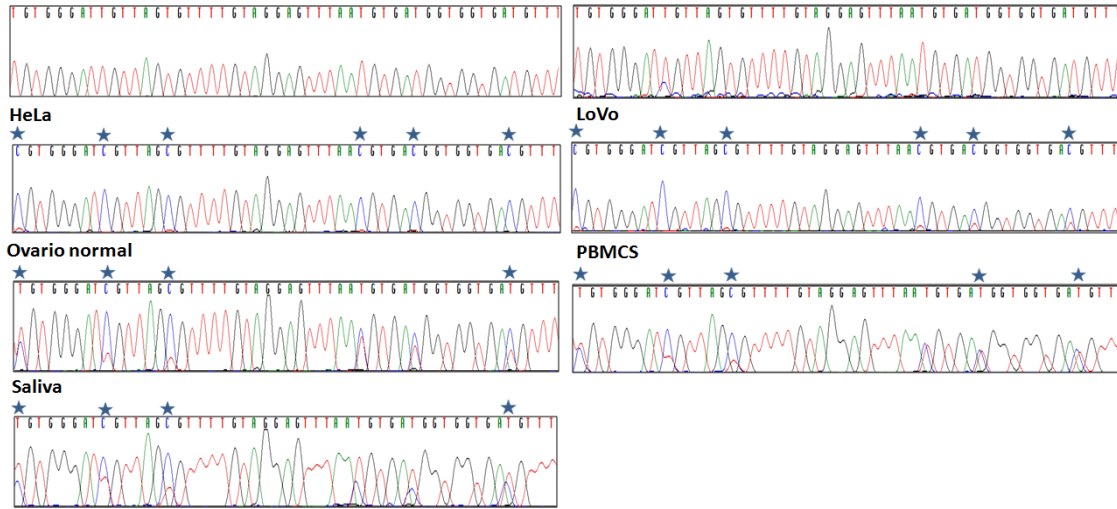


Figura 17. Secuenciación por bisulfito del gen *CFD*. Area1. Representación de un fragmento de secuencia del área 1 del gen *CFD* de ADN modificado por bisulfito procedente de las líneas tumorales sensibles y resistentes A2780, tejido normal de ovario procedente de pacientes sometidas a cambio de sexo, ADN procedente de Células Mononucleadas de Sangre Periférica (PBMC's) y ADN extraído de epitelio bucal. Las líneas tumorales secuenciadas fueron de cáncer de cérvix (HeLa) y adenocarcinoma de colon (LoVo). Todas las muestras fueron secuenciadas con el cebador sentido. Las posiciones metiladas se indican con un asterisco azul.

CFD

OVCA3-S

OVCA3-R

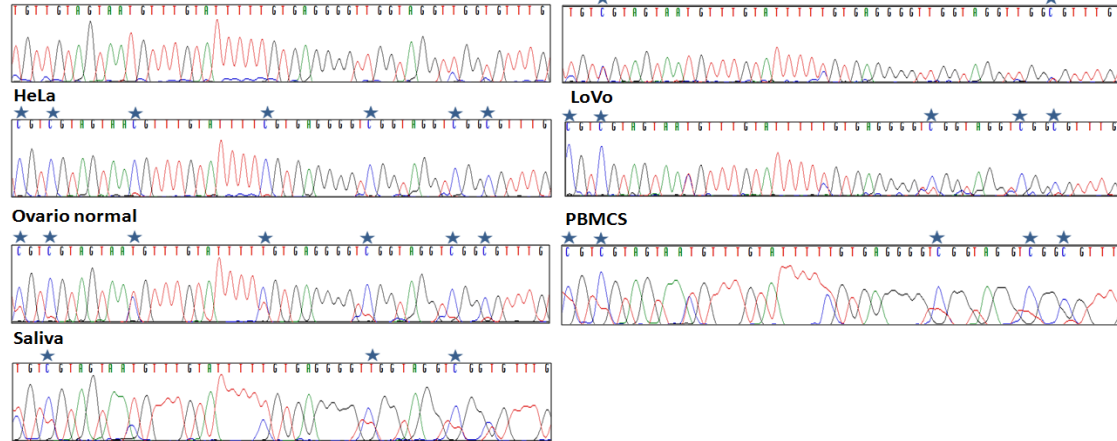


Figura 18. Secuenciación por bisulfito del gen *CFD*. Área 2. Representación de un fragmento de secuencia del área 2 del gen *CFD* de ADN modificado por bisulfito procedente de las líneas tumorales sensibles y resistentes A2780, tejido normal de ovario procedente de pacientes sometidas a cambio de sexo, ADN procedente de Células Mononucleadas de Sangre Periférica (PBMC's) y ADN extraído de epitelio bucal. Las líneas tumorales secuenciadas fueron de cáncer de cérvix (HeLa) y adenocarcinoma de colon (LoVo). Todas las muestras fueron secuenciadas con el cebador sentido. Las posiciones metiladas se indican con un asterisco azul.

RESULTADOS

PAX9 y FKBP1B: Los siguientes candidatos a validar fueron *PAX9* y *FKBP1B*. No se detectó metilación en los controles secuenciados ovario normal y PBMCs, en ninguno de los dos genes, ni tampoco en la línea tumoral de ovario observada como no metilada por WGBS (A2780), figuras 19 y 20. Se observó una clara metilación diferencial en la línea resistente de OVCAR3 en los dos genes identificados como metilados con el valor β seleccionado, mientras que en la línea sensible no se identificó metilación. Estos resultados confirman los datos obtenidos en WGBS para estos dos genes y valida la selección de los parámetros β . También se observó metilación de *PAX9* en las líneas tumorales HeLa y BT747, figura 19 y de *FKBP1B* en las líneas HeLa, PC3 y LoVo, figura 20. Estas líneas adicionales estudiadas son líneas en las que la IC50 a cisplatino es elevada, lo que hace que se puedan considerar como líneas celulares con elevado grado de resistencia. Los IC50 correspondientes son: HeLa (3), BT747 (25) y LoVo (3).

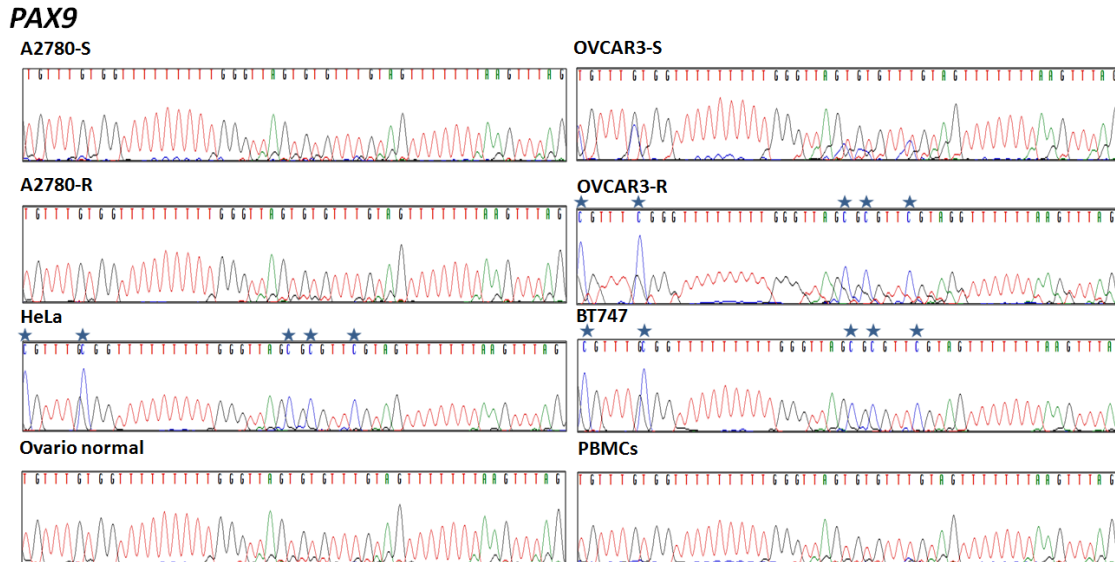


Figura 19. Secuenciación por bisulfito del gen *PAX9*. Representación de un fragmento de secuencia del área del gen *PAX9* de ADN modificado por bisulfito procedente de las líneas tumorales sensibles y resistentes A2780 y OVCAR3, tejido normal de ovario procedente de pacientes sometidas a cambio de sexo, ADN procedente de Células Mononucleadas de Sangre Periférica (PBMC's) y líneas tumorales de cáncer de cérvix (HeLa) y carcinoma de mama (BT747). Todas las muestras fueron secuenciadas con el cebador sentido. Las posiciones metiladas se indican con un asterisco azul.

RESULTADOS

FKBP1B

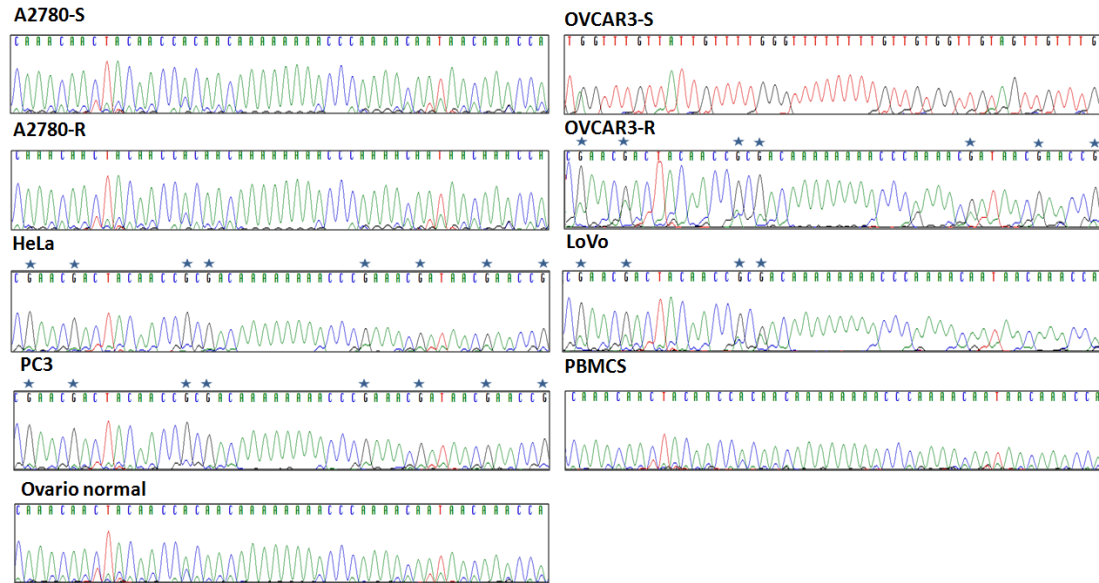


Figura 20. Secuenciación por bisulfito del gen *FKBP1B*. Representación de un fragmento de secuencia del área del gen *FKBP1B* de ADN modificado por bisulfito procedente de las líneas tumorales sensibles y resistentes A2780 y OVCAR3, tejido normal de ovario procedente de pacientes sometidas a cambio de sexo, ADN procedente de Células Mononucleadas de Sangre Periférica (PBMC's) y líneas tumorales de cáncer de cérvix (HeLa), adenocarcinoma de colón (LoVo) y carcinoma de próstata (PC3). Todas las muestras fueron secuenciadas con el cebador antisentido excepto OVCAR3-S. Las posiciones metiladas se indican con un asterisco azul.

En la figura 21 se representa de otra manera la metilación diferencial identificada en *PAX9* y *FKBP1B*. Se observan claramente diferencias entre las líneas resistente y sensible en la metilación de posiciones CpG concretas analizadas individualmente, así como en la metilación total del área estudiada. En la representación de la distribución se distingue de forma evidente un mayor grado de metilación en el grupo resistente frente al sensible y de manera significativa para cada uno de los genes, figura 21. Comparando las medianas de distribución en resistencia se observa que el gen *FKBP1B* exhibe discretamente una mayor metilación que *PAX9*, figura 21. Este análisis permite además encuadrar de modo más restrictivo los valores β para obtener un mayor éxito en la selección futura de candidatos.

RESULTADOS

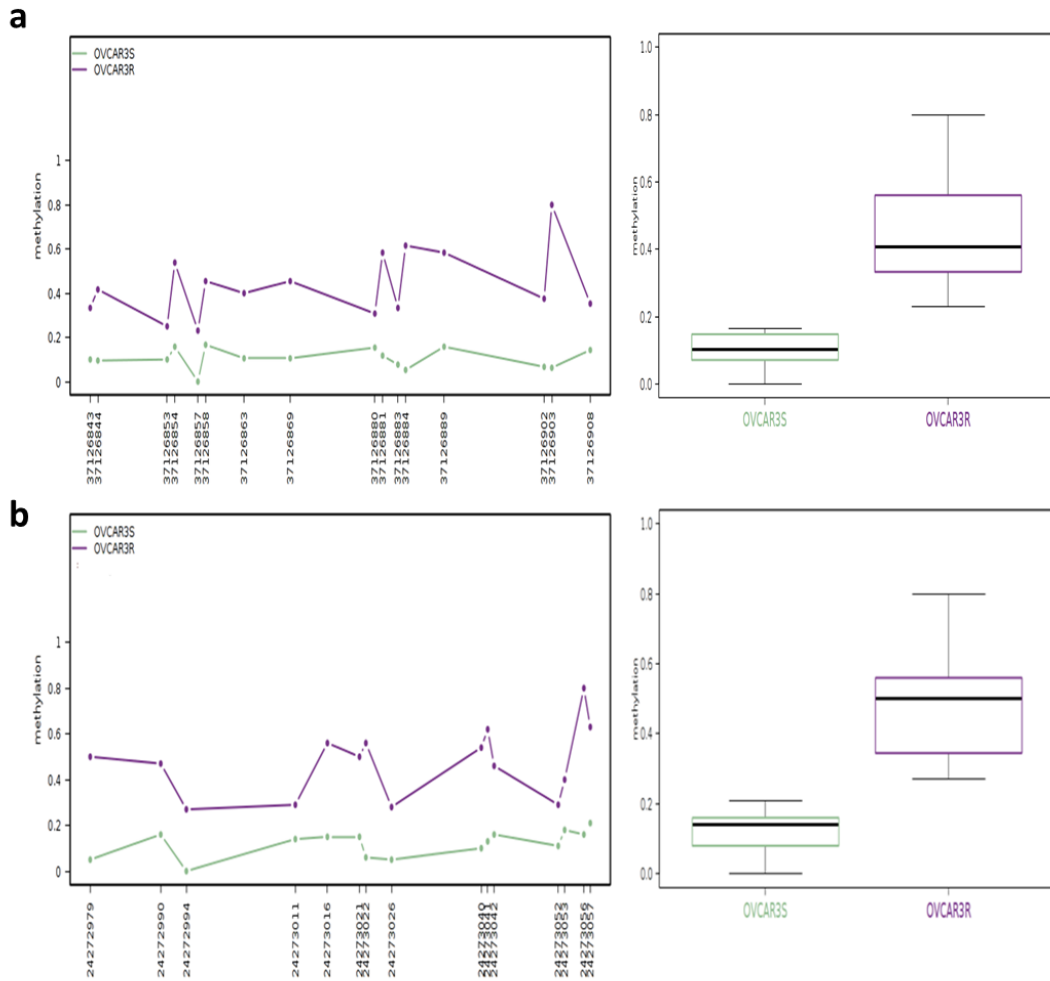


Figura 21. Distribución de la metilación en Resistencia Vs Sensibilidad de los genes (a) *PAX9* y (b) *FKBP1B*. En el gráfico de la izquierda se representa la metilación de posiciones CpG específicas, indicadas por su posición cromosómica en el área seleccionada como diferencialmente metilada en cada grupo experimental S y R. El grafico de la derecha muestra la distribución de la metilación de las posiciones CpG del área validada de cada uno de los genes en cada grupo experimental S y R, ($p < 0,05$). Los dos genes se encuentran diferencialmente metilados en la línea tumoral OVCAR3-R.

La cuantificación de la metilación por Methyl Light mostró un porcentaje 4,7 veces superior (95% versus 20%) en la región analizada del gen *FKBP1B* del grupo resistente comparado con el sensible. Se observó además una disminución de un 13% de moléculas metiladas en el grupo RT comparado con el resistente en el gen *FKBP1B*, figura 22a. En el caso de *PAX9*, la metilación fue 6 veces superior (60% versus 10%) en resistencia vs sensibilidad. El fenotipo de reactivación epigenética exhibió un 15% menos de metilación comparado con el resistente, figura 22b. Estos hallazgos sugieren que el tratamiento con cisplatino indujo mayor metilación en el gen *PAX9* que en *FKBP1B* comparando resistencia Vs sensibilidad. Como control de la técnica se analizaron los niveles de metilación de DNA procedente de ovario normal,

RESULTADOS

en la cual no se detectó grado alguno de metilación para ninguno de los dos genes, en congruencia con los resultados obtenidos de la secuenciación Sanger.

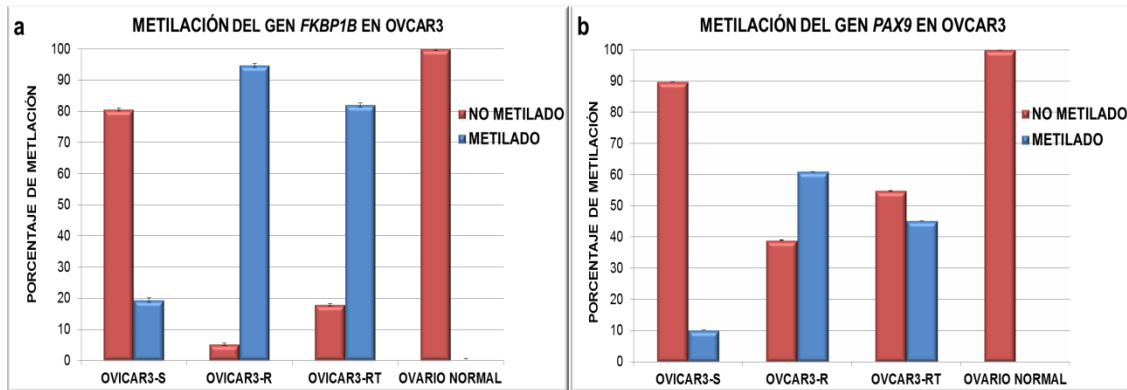


Figura 22. Niveles de metilación absoluta para los genes *FKBP1B* y *PAX9* evaluados MethyLight.

Los datos representan el número de moléculas metiladas y no metiladas analizadas en la misma muestra a través del uso de sondas diferencialmente marcadas para identificar específicamente presencia o ausencia de citosinas metiladas. Se representa el porcentaje asociado a cada tipo de ADN identificado para cada muestra, obtenido a partir tres réplicas para cada ensayo. Cada ensayo se repitió dos veces. La muestra de ovario normal se ha incluido como control del ensayo. a) *FKBP1B* b) *PAX9*. Las barras representan la media \pm D.E. de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

4.6. Validación transcripcional de los genes *PAX9* y *FKBP1B* en las líneas celulares humanas de cáncer de ovario.

Con el ánimo de validar los resultados obtenidos en los análisis con microarrays de expresión y demostrar la asociación entre la presencia de metilación y la inhibición transcripcional, se llevaron a cabo amplificaciones por PCR a tiempo real para los dos genes en los 3 grupos experimentales de la línea validada OVCAR3.

Tanto el gen *PAX9* como el gen *FKBP1B* tenían inhibida su expresión en el grupo resistente comparados con el sensible de manera significativa, con una $p < 0,01$, figura 23. Este patrón de expresión en resistencia correlaciona con el estado de metilación observado por diferentes técnicas: WGBS, secuenciación Sanger y MethyLight. Para tener certeza de este hecho, la expresión de los dos genes fue evaluada en el grupo experimental tratado con los fármacos 5aza-dC y TSA. Los resultados encontrados muestran la re-expresión significativa de los dos genes en el grupo experimental RT comparado con el Resistente con una $p < 0,001$, figura 23, lo que indica que el tratamiento farmacológico favorece la inducción de la expresión génica y que la transcripción de estos genes estaría bajo regulación epigenética.

RESULTADOS

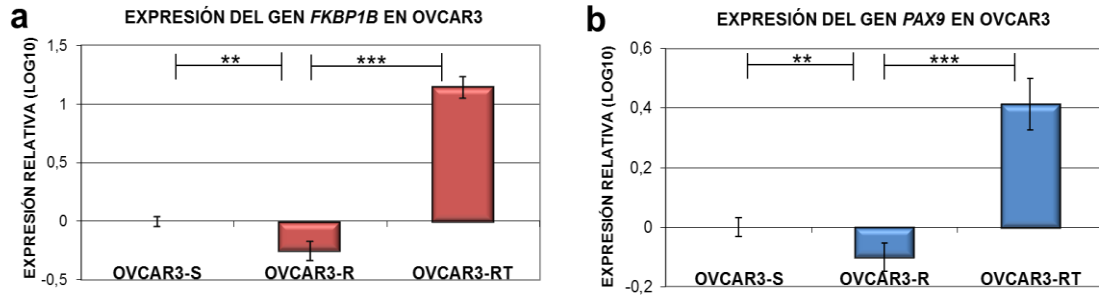


Figura 23. Expresión relativa de los niveles de *FKBP1B* y *PAX9* medida por qRT-PCR. Los datos están representados en escala Log10 usando el grupo experimental sensible como calibrador. Los niveles de expresión de cada gen fueron normalizados usando *GAPDH* como control endógeno. Los ensayos se realizaron en las tres condiciones experimentales de la línea OVCAR3, S: sensible; R: resistente; RT: reactivation treatment. ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$. Las barras representan la media \pm D.E. de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

4.7. Validación funcional de la implicación de los genes *PAX9* y *FKBP1B* en la viabilidad celular al agente cisplatino.

La asociación entre la respuesta al tratamiento con cisplatino y la sobreexpresión exógena de estos dos genes se demostró a través de experimentos de transfección con el ADNc del gen correspondiente en la línea tumoral OVCAR3-R. La sobreexpresión del gen *FKBP1B* indujo un aumento en la sensibilidad a CDDP reflejado en la disminución de la supervivencia, alcanzando los valores de respuesta a cisplatino de la línea tumoral sensible OVCAR3-S, figura 24. El grupo transfectado con el plásmido *PAX9* no mostró cambios en la sensibilidad, figura 24. El valor IC50 para el grupo OVCAR3-R *FKBP1B* fue 1,3 $\mu\text{g/ml}$ (D.E \pm 0,08) y en el grupo control de 2 $\mu\text{g/ml}$ (D.E \pm 0,02), por tanto el índice de resistencia entre estos dos grupos fue de 1,53 con una $p \leq 0,01$.

RESULTADOS

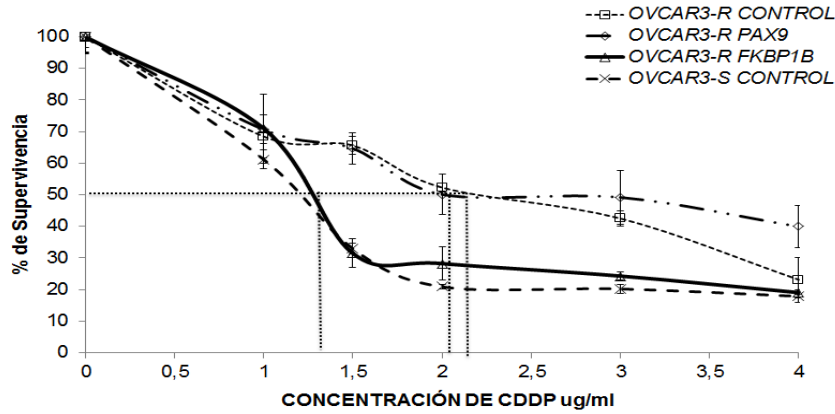


Figura 24. Viabilidad celular a cisplatino del grupo OVCAR3-R transfectado con los genes *PAX9* y *FKBP1B*. Los datos se normalizaron respecto al grupo control no tratado de cada grupo el cual fue representado como el 100% de supervivencia y se muestran como la media de la desviación estándar de al menos 2 experimentos independientes realizados por cuadruplicado para cada concentración del fármaco. OVCAR3-CONTROL representa al grupo no transfectado.

Como control de sobreexpresión a las 72 horas, cuando se valoró la repuesta al tratamiento con platino, se determinaron los niveles de expresión a través de PCR a tiempo real. Los niveles de expresión de *PAX9* a 24 horas y 72 horas de transfección fueron más elevados que los de *FKBP1B*. Se destaca la diferencia a 24 horas, en donde la expresión de *PAX9* fue 20 veces más alta que *FKBP1B*, figura 25. Esta validación evidencia la transitoriedad de la sobre-expresión, especialmente relacionada con la transfección del gen *PAX9*, pues se observa una drástica disminución en la expresión a las 72 horas de la transfección figura 25, aproximadamente de 243 veces, mientras que para el gen *FKBP1B* esta disminución solo fue de 1,1 veces.

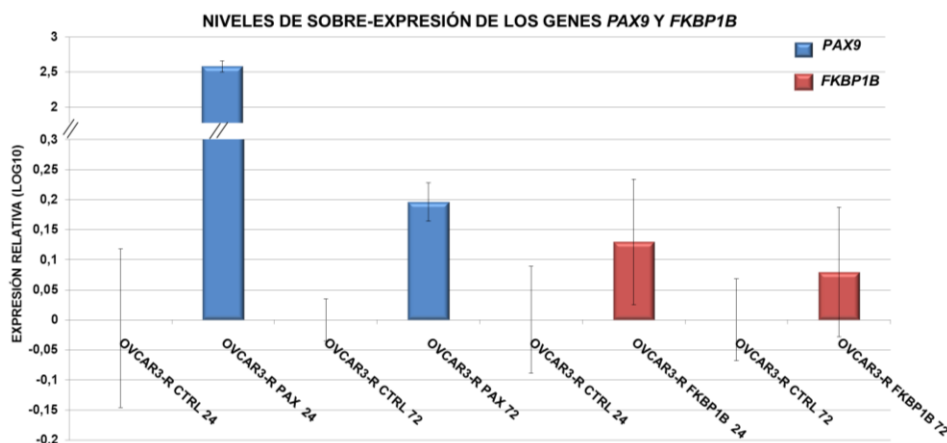


Figura 25. Validación de la transfección génica de *PAX9* y *FKBP1B*. La sobre-expresión de ambos genes fue validada a través del análisis por qRT-PCR de los genes transfectados en cada grupo experimental. La expresión del gen transfectado fue normalizada respecto al gen endógeno *GAPDH* y contrastada con el grupo control (OVCAR3-CONTROL) a 24 y 72 horas de la transfección. Las barras representan la media \pm D.E. de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

RESULTADOS

4.8. Validación traslacional de los genes candidatos *PAX9* y *FKBP1B*.

Una vez estudiado el papel de estos genes en la viabilidad celular a cisplatino, nos centramos en valorar su potencial implicación en la respuesta terapéutica en muestras de tumores primarios.

4.8.1. Análisis de la metilación de *PAX9* y *FKBP1B* en las cohortes de pacientes.

Las frecuencias de metilación en los diferentes grupos de pacientes se determinaron a través de la PCR de metilación específica (MSP). Las frecuencias de metilación para el gen *PAX9* mostraron porcentajes similares en las cohortes del Hospital Universitario de la Paz, IDIS-CHUS y del Hospital Parc de Salut Mar, siendo de un 20%, 17,31% y 16,67% respectivamente. En la cohorte de muestras de pacientes resistentes y refractarios del Centro Integral Oncológico Clara Campal se halló un 10% de metilación de *PAX9* y la frecuencia más baja correspondió a la cohorte de pacientes del CNIO con un 5,13% de metilación. La frecuencia de metilación de este gen de acuerdo al origen de la muestra fue de un 18% en tejido congelado y 12% en tumores procedentes de parafina. Para el gen *FKBP1B* las frecuencias encontradas para las cohortes de muestras congeladas fueron de un 10% en la cohorte del Hospital Universitario de la Paz y 13,46% para IDIS-CHUS. La cohorte del Hospital Parc de Salut Mar mostró la mayor frecuencia de metilación con un 54,05%, seguida de la cohorte del CNIO con un 17,95%. En las 10 muestras de pacientes del Centro Clara Campal no se halló ninguna muestra metilada. De manera general, la metilación de *FKBP1B* en las muestra procedentes de tejido congelado tuvo una frecuencia de 13%, mientras que las parafinadas exhibieron un 38% de frecuencia. En las figuras 26 y 27 se muestra una representación de las amplificaciones por MSP de los genes *PAX9* y *FKBP1B*.

RESULTADOS

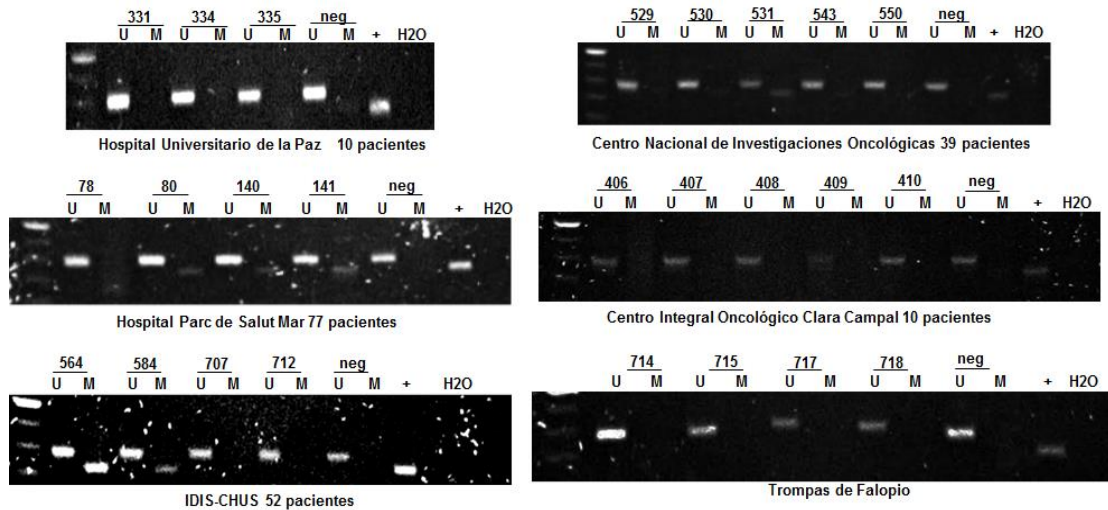


Figura 26. PCR de metilación específica para el gen *PAX9*. MSP representativas del análisis del gen *Pax9* en cada una de las cohortes de carcinoma de ovario. Se muestra también la amplificación de una serie de muestras de tejido normal (trompa de Falopio) en las que se observa la ausencia de metilación. Para cada muestra la presencia de un producto en el carril M fue considerado como ADN metilado, mientras que la amplificación de producto en el carril U fue como considerado como no metilado. Los controles negativos y positivos para cada reacción corresponden a ADN proveniente de PBMCs y ADN metilado *in vitro* respectivamente. La región no metilada de *FKBP1B* tiene un tamaño de 84 pb y la región metilada de 72 pb. Las muestras 80, 140, 141, 564 y 584 aparecen metiladas.

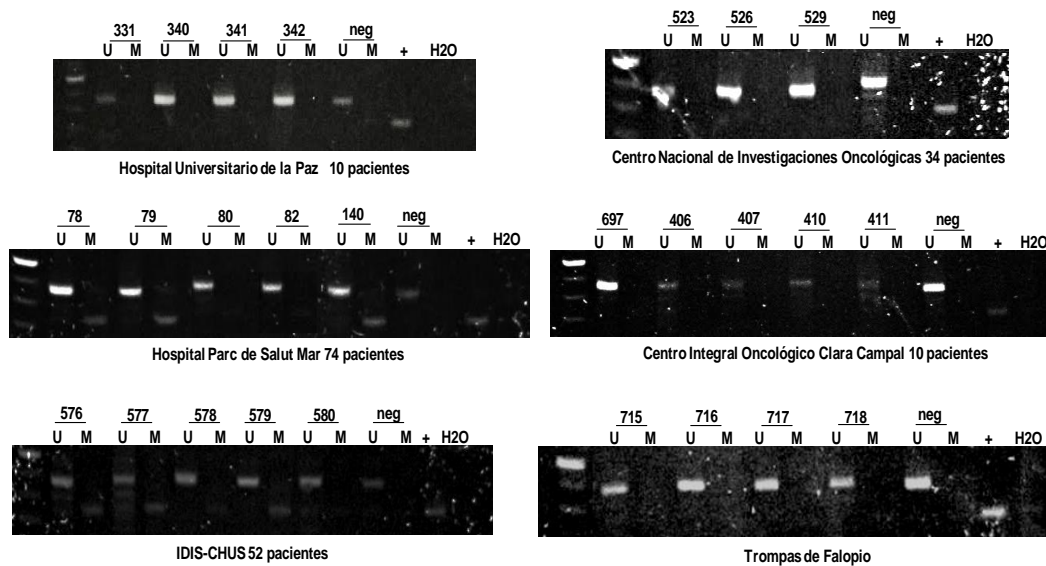


Figura 27. PCR de metilación específica para el gen *FKBP1B*. MSP representativas del análisis del gen *FKBP1B* en cada una de las cohortes de carcinoma de ovario. Se muestra también la amplificación de una serie de muestras de tejido normal (trompa de Falopio) en las que se observa la ausencia de metilación. Para cada muestra la presencia de un producto en el carril M fue considerado como ADN metilado, mientras que la amplificación de producto en el carril U fue como considerado como no metilado. Los controles negativos y positivos para cada reacción corresponden a ADN proveniente de PBMCs y ADN metilado *in vitro* respectivamente. La región no metilada de *FKBP1B* tiene un tamaño de 84 pb y la región metilada de 72 pb. Las muestras 78, 79, 140, 576, 577 y 579 aparecen metiladas.

RESULTADOS

4.8.2. Análisis de la expresión de los genes *PAX9* y *FKBP1B* en muestras quirúrgicas.

La expresión de los genes candidatos fue evaluada en las cohortes de pacientes con muestras de tejido congelados procedentes del Hospital Universitario de La Paz e IDI-CHUS. La expresión de *FKBP1B* y *PAX9* fue cuantificada en 11 muestras de trompa de Falopio empleadas como controles para determinar la expresión relativa de estos genes en los tumores. En cada ensayo los controles seleccionados se unificaban como uno solo y se contrastaban con los datos de las muestras, por esta razón solo se representa una barra control en la figura 28. La cuantificación mostró perfiles de expresión diferentes para cada uno de los genes analizados. Se observó niveles bajos de expresión del gen *FKBP1B* en un 77% de los pacientes, indicando la tendencia de este gen a estar inhibido en muestras tumorales, mientras que el gen *PAX9* muestra un perfil con tendencia bimodal, en donde un 45% pacientes mostraron inhibición y 55% sobre-expresión.

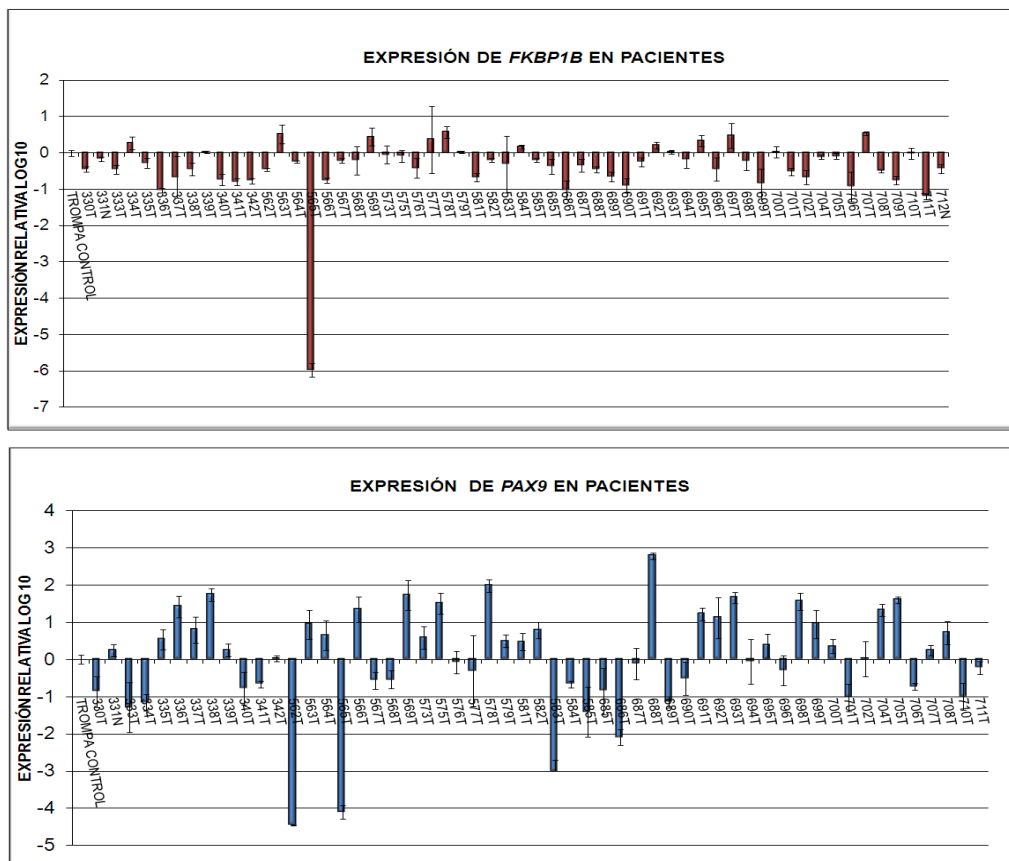


Figura 28. Expresión relativa de los genes *PAX9* y *FKBP1B* en las cohortes de pacientes HULP e IDI-CHUS mediante qRT-PCR. Los datos están representados en escala Log10 del valor 2^{-ddCt} . Se ha tomado el conjunto de las muestras control de trompa de Falopio como calibrador de la expresión génica. Los niveles de expresión de cada gen fueron normalizados usando *GAPDH* como control endógeno. Las barras representan la media \pm D.E. de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

RESULTADOS

4.8.3. Análisis estadísticos relacionados con los cambios en la expresión y grado de metilación de *PAX9* y *FKBP1B*.

A continuación estudiamos la posible asociación entre el grado de metilación y los niveles de expresión de los genes *PAX9* y *FKBP1B* con las características clínicas de los pacientes obtenidos de las diferentes cohortes. Se encontraron asociaciones de interés con los datos clínicos en la cohorte de tumores frescos vinculados al gen *PAX9*. Esta observación fue estadísticamente significativa entre el tipo de quimioterapia y la metilación del gen con un p valor de 0,0385, como era de esperar según los protocolos de tratamiento estandarizados para este tipo tumoral, lo que garantiza la homogeneidad de las cohortes de estudio, tabla 10. En esta tabla se muestran todos los análisis realizados en los pacientes pertenecientes a las cohortes HULP e IDI-CHUS asociados con la determinación cualitativa de la metilación de *PAX9*, y también el umbral seleccionado en la determinación cuantitativa por qMSP. Al relacionar los resultados obtenidos por las dos técnicas observamos que el menor porcentaje de metilación asociado a un resultado positivo por MSP fue de 29,74%, por tanto se consideraron metilados por qMSP los pacientes con valores por encima de este umbral. Es importante notar que de 39 pacientes no metilados para *PAX9*, el 62% no asoció con recurrencia, que es el parámetro clínico utilizado por ASCO y SEOM para valorar la respuesta terapéutica. En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos de los análisis de *FKBP1B* en donde no se halló ninguna relación significativa.

RESULTADOS

Hospital Universitario de la Paz e IDIS-CHUS	General (n=47)		PAX9 no metilado MSP PAX9 no metilado < 29,74% qMSP (n=39)		PAX9 metilado MSP PAX9 metilado >29,74% qMSP (n=8)		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
Muerte							0,2690
No	21	44,68	19	48,72	2	25	
Si	26	55,32	20	51,28	6	75	
CDDP-Status							0,2516
Sensible	18	38,30	14	35,90	4	50	
Resistente	21	44,63	17	43,95	4	50	
NA	8	17,02	8	20,51	0	0	
Recurrencia							0,6632
Si	15	39,47	12	37,50	3	50	
No	23	60,53	20	62,50	3	50	
Quimioterapia							0,0385
No	4	8,51	4	10,26	0	0	
Platino + taxano	30	63,83	27	69,23	3	37,5	
Platino	3	6,38	1	2,56	2	25,0	
,Platino + CTX	8	17,02	6	15,38	2	25,0	
Otros	2	4,26	1	2,56	1	12,5	
Grado							0,3240
0	4	8,51	4	10,26	0	0	
1	14	29,79	10	25,64	4	50	
2	11	23,40	8	20,51	3	37,5	
3	17	36,17	16	41,03	1	12,5	
NA	1	2,13	1	2,56	0	0	
Histología							0,9611
Seroso	26	55,32	21	53,85	5	62,5	
Endometroide	6	12,77	6	15,38	0	0	
Mucino	3	6,38	2	5,13	1	12,5	
Células claras	3	6,38	3	7,69	0	0,0	
NA	9	19,15	7	17,95	2	25,0	
Tipo							0,5905
Adenocarcinoma	21	44,68	18	46,15	3	37,5	
Carcinoma	17	36,17	12	30,77	5	62,5	
Cistoadenocarcinoma	8	17,02	8	20,51	0	0	
NA	1	2,13	1	2,56	0	0	

Tabla 10. Tabla de contingencia de la determinación cualitativa y cuantitativa de la metilación PAX9 en la cohorte HULP/IDI-CHUS. Tabla demográfica de 47 pacientes de las cohortes CHUS-IDI y HULP La Paz en la que se representa las asociaciones estadísticas entre cada parámetro clínico valorado y la presencia de metilación en el gen PAX9. No se incluyeron los datos obtenidos por qMSP ya que estos se validaban por las dos técnicas. Los resultados independientes de todas las cohortes así como los datos clínicos individuales se muestran en Anexo 1 (Tablas 4, 5, 6 y 7).

RESULTADOS

Hospital Universitario de la Paz e IDIS-CHUS	General (n=49)		FKBP1B No metilado MSP (n=45)		FKBP1B metilado MSP (n=4)		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
Muerte							0,3136
	Si	22	44,90	19	42,22	3	75
	No	27	55,10	26	57,78	1	25
CDDP-Status							0,9382
	Sensible	19	38,78	19	42,22	0	0
	Refractario	18	36,73	14	31,11	4	100
	Resistente	3	6,12	3	6,67	0	0
	NA	9	18,37	9	20,00	0	0
Recurrencia							0,2832
	Si	16	40,00	13	36,11	3	75
	No	24	60,00	23	63,89	1	25
Quimioterapia							0,3363
	No	4	8,16	4	8,89	0	0
	Platino + taxano	31	63,27	27	60,00	4	100
	Platino	3	6,12	3	6,67	0	0
	,Platino + CTX	8	16,33	8	17,78	0	0
	Otros	3	6,12	3	6,67	0	0
Grado							0,5358
	0	4	8,16	4	8,89	0	0
	1	15	30,61	14	31,11	1	25
	2	11	22,45	10	22,22	1	25
	3	18	36,73	16	35,56	2	50
	NA	1	2,04	1	2,22	0	0
Histología							0,2921
	Seroso	26	53,06	24	53,33	2	50
	Endometroide	7	14,29	7	15,56	0	0
	Mucino	3	6,12	3	6,67	0	0
	Células claras	3	6,12	3	6,67	0	0
	NA	9	18,37	7	15,56	2	50
Tipo							0,4491
	Adenocarcinoma	21	42,86	19	42,22	2	50
	Carcinoma	18	36,73	16	35,56	2	50
	Cistoadenocarcinoma	9	18,37	9	20,00	0	0
	NA	1	2,04	1	2,22	0	0

Tabla 11. Tabla de contingencia de la determinación cualitativa de la metilación de FKBP1B en la cohorte HULP/IDI-CHUS. Tabla demográfica de 49 pacientes de las cohortes CHUS-IDI y HULP La Paz en la que se representa las asociaciones estadísticas entre cada parámetro clínico valorado y la presencia de metilación en el gen FKBP1B.

Con el objetivo de confirmar si la presencia de metilación o los niveles de expresión de PAX9 influyen en la respuesta terapéutica, se realizaron análisis de supervivencia global y tiempo libre a la progresión. Los análisis entre la expresión y la metilación para cada parámetro clínico de la cohorte de tumores frescos identificaron diferencias significativas en la supervivencia global relacionada con la respuesta terapéutica y la

RESULTADOS

metilación de *PAX9*. Los pacientes resistentes al tratamiento que muestran metilación de *PAX9* fallecieron antes que los pacientes resistentes en los que no se halló metilación. Este análisis fue estadísticamente significativo en los dos tipos de determinaciones, cualitativa y cuantitativa, $p=0,017$ y $p=0,024$ respectivamente, figuras 29a y 29b. La media de supervivencia en el total de los pacientes analizados sin discriminar entre grados de resistencia no fue significativa, figuras 29c y d con $p=0,149$ y $0,54$ para ambas determinaciones.

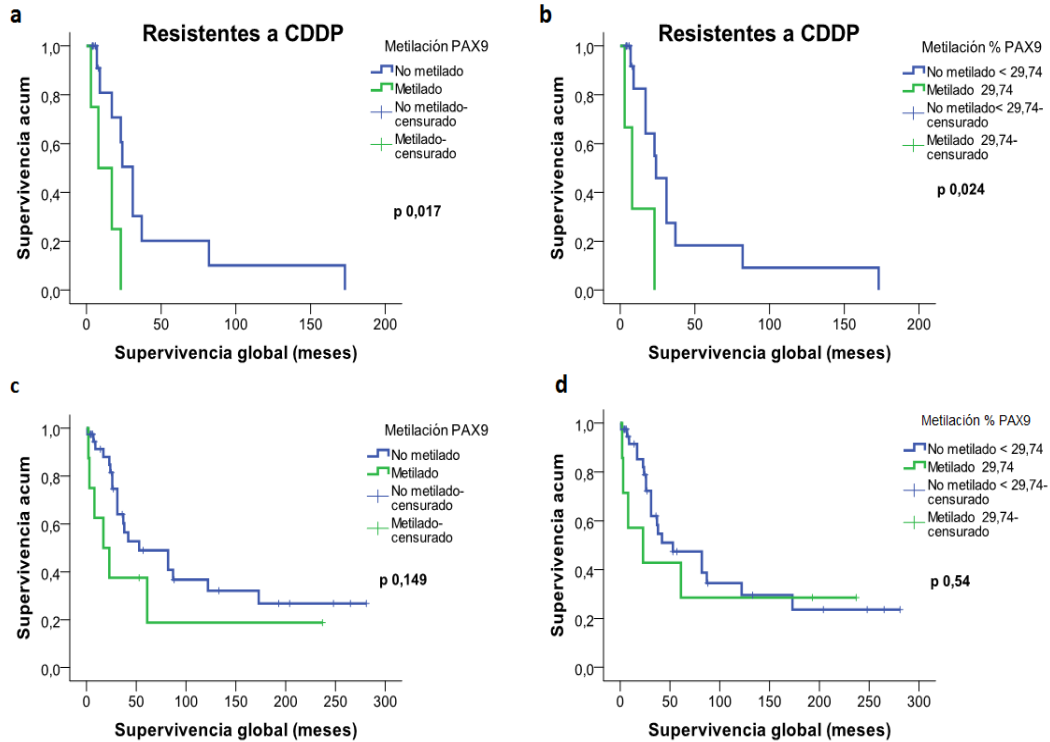


Figura 29. Análisis de supervivencia global relacionada con la metilación de *PAX9* y la respuesta al tratamiento. Los análisis de supervivencia global asociada con la respuesta al tratamiento y la metilación de *PAX9* se realizaron con 21 pacientes, figuras a y b. Los análisis de supervivencia global representados en las figuras c y d se realizaron con 47 pacientes. La determinación cualitativa de la metilación corresponde a las figuras a y c y la cuantitativa a las figuras b y d. El "LogRank test" fue utilizado para comprar las curvas y un cambio $p \leq 0,05$ fue considerado como significativo.

Nuestra búsqueda de biomarcadores está enfocada en la identificación de candidatos cuya hipermetilación disminuya su expresión, es decir, exhiban una correlación negativa entre estas dos variables. Los análisis realizados en las muestras de origen congelado muestran que no existe este tipo de correlación para el gen *PAX9*, como se ilustra en la figura 30. En el caso de *FKBP1B* se observa una tendencia en la disminución de la expresión en las muestras que exhiben mayor metilación, con un coeficiente de correlación o R de -0,375 y una asociación lineal o R^2

RESULTADOS

del 12,9%. El análisis de regresión lineal para estas dos variables en *FKBP1B* resultó estadísticamente significativo con un $p \leq 0,01$.

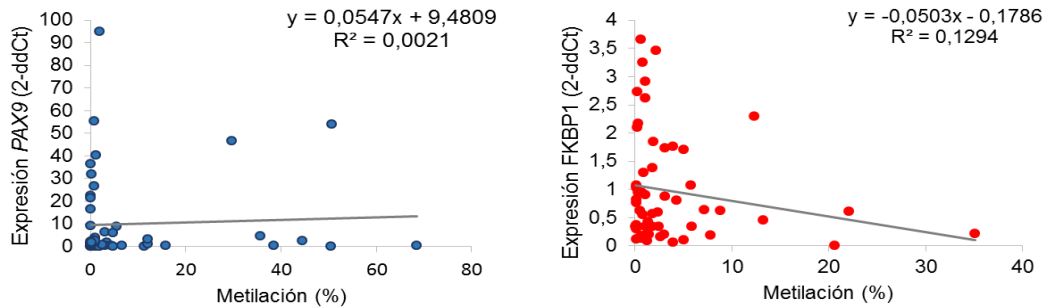


Figura 30. Correlación entre metilación y expresión de los genes *PAX9* y *FKBP1B* en la cohorte de tumores frescos. Los análisis se llevaron a cabo en 55 y 57 pacientes para *PAX9* y *FKBP1B* respectivamente, pertenecientes a la cohorte de tumores frescos. Los datos para *PAX9* no muestran ningún tipo de tendencia, pero para *FKBP1B* el 12,9% de la variabilidad en la expresión se explica por la metilación del gen.

El análisis de los datos del TCGA permitió obtener la información clínica de 565 pacientes con cáncer de ovario con el fin de comprobar si los resultados de nuestra cohorte se reproducían en un grupo mayor de pacientes. Respecto a los análisis de correlación metilación/expresión en los dos genes, los resultados del TCGA concuerdan con nuestros hallazgos ya que se identifica una tendencia no significativa del gen *FKBP1B* a expresarse en menor medida cuanto más metilado está, figura 31. Igual que lo observado en nuestra cohorte, no existe ninguna de correlación en *PAX9*, figura 31. El umbral utilizado para el análisis de la metilación de *PAX9* en esta caso fue un valor β de 0,2 que es el empleado en los arrays de metilación (Bibikova et al., 2009). Para *FKBP1B* se utilizó como umbral la mediana de metilación (0,02), pues con el valor de 0,2 empleado para *PAX9* no se identificaba ningún paciente metilado.

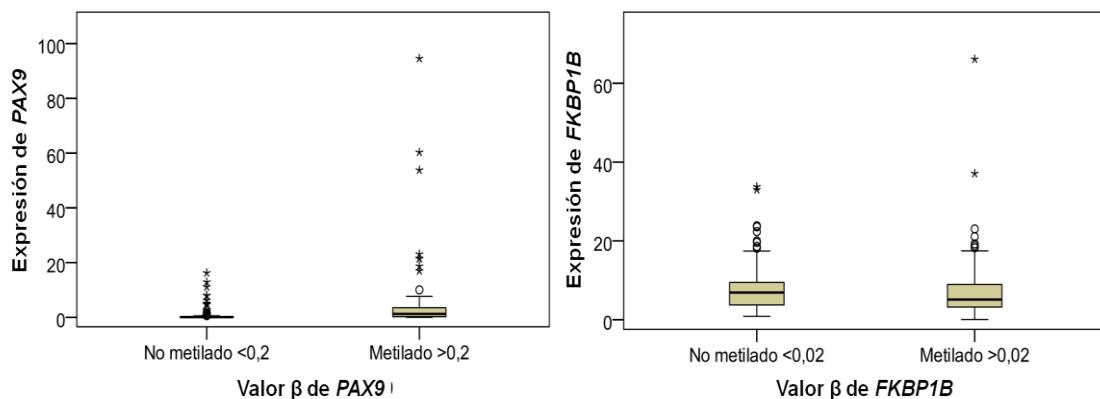


Figura 31. Comparación de la metilación y la expresión entre *PAX9* y *FKBP1B* en los pacientes procedente del TCGA. Los datos de metilación y expresión fueron analizados en 565 pacientes.

RESULTADOS

Respecto al estudio de la metilación entre los dos genes, se identificó a *PAX9* como el gen con mayor metilación tanto en los pacientes de nuestra cohorte como en el TCGA, grupo en el que se determinó una diferencia estadísticamente significativa, figura 32.

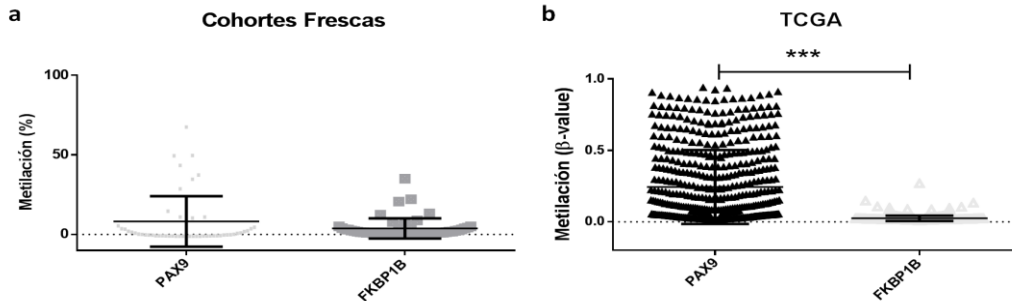


Figura 32. Comparación del porcentaje de metilación entre *PAX9* y *FKBP1B* en la cohorte de tumores frescos y pacientes del TCGA. *PAX9* exhibe mayor metilación en los dos grupos analizados con significación estadística en el TCGA *** $p \leq 0,001$.

La falta de uniformidad entre nuestra información clínica y la del TCGA impidió reproducir los estudios estadísticos llevados a cabo en nuestra cohorte. Sin embargo, a través de una herramienta web llamada Kaplan Meier plotter (<http://kmplot.com/analysis/>) (Szász et al., 2016) exploramos los datos del TCGA y encontramos un hallazgo de interés sobre *PAX9*. En la figura 33a se muestra la influencia de la expresión de *PAX9* en el tiempo libre de progresión con una tendencia muy cercana a la significancia estadística. Este evento no identificado en nuestra cohorte muestra que aquellos pacientes con menor expresión del gen recaen más rápidamente. Esta herramienta cuenta con datos del TCGA y GEO (Gene Expression Omnibus), cuando el análisis fue realizado seleccionando todos las bases de datos se obtuvo una significación estadística con un p valor de 0,0041, figura 33b.

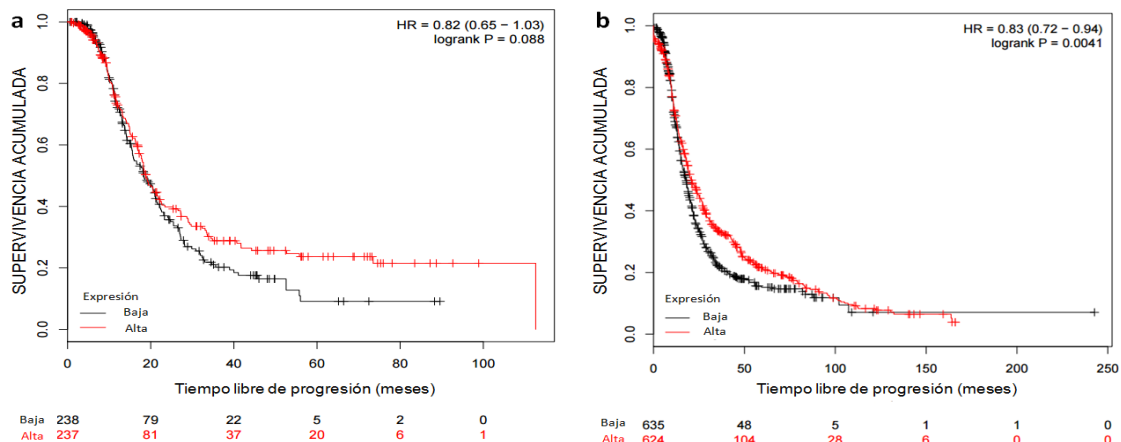


Figura 33. Análisis del tiempo libre de progresión relacionado con la expresión de *PAX9*. a) Este análisis fue realizado en 475 pacientes del TCGA. b) El aumento del tamaño muestral permitió obtener una diferencia significativa entre las curvas. En este caso se analizaron 1275 pacientes. El “Log Rank test” fue utilizado método de comparación y un cambio $p \leq 0,05$ fue considerado como significativo.

5. Establecimiento de las bases para el desarrollo de una matriz diagnóstica, predictiva de respuesta a Platino: Objetivo 2.

Este segundo diseño experimental se compone de características bioinformáticas diferentes a las usadas en la primera aproximación y se basa en múltiples combinaciones entre las técnicas de cribado de alto rendimiento, con el fin de sentar las bases para el desarrollo de una futura matriz bioinformática predictiva.

5.1. Análisis del metiloma.

La estrategia de filtrado de posiciones CpG implementada en este segundo diseño experimental parte del mismo número de lecturas totales obtenidas por WGBS, con la diferencia de que en este caso se ha considerado la lectura en cada hebra como una única posición CpG, con el fin de tener certeza de que cada una de ellas corresponde a un dinucleótido real y no se origina de una mutación puntual.

Los resultados obtenidos en el primer objetivo de esta tesis permitieron implementar los parámetros bioinformáticos para diseñar el presente abordaje. Se utilizaron dos rangos de valores β , uno de ellos similar al empleado en la primera parte ($\beta > 0,4$ en R y $\beta < 0,23$ en S) a través del cual se logró la validación del 50% de los candidatos; y se decidió añadir otros dos valores β , mucho más restrictivos en muestras sensibles en las que se espera obtener citosinas no metiladas ($\beta < 0,16$ en S) pero permitiendo menores valores β en resistencia ($\Delta\beta$ de 0,14 entre R y S) para poder capturar pequeñas tendencias de aparición de metilación en resistencia, figura 34. Estos parámetros bioinformáticos junto con el filtro de lecturas establecido en un 10X condujeron a la identificación de 126.413 y 81.350 CpGs diferencialmente metilados en A2780-R y OVCAR-R respectivamente. Estos resultados incluyen 11.661 genes con al menos una posición CpG diferencialmente metilada en la región interrogada para al menos uno de los transcritos de dichos genes, obteniendo así 35.468 transcritos distintos diferencialmente metilados, figura 34.

Las áreas interrogadas en este diseño corresponden a las zonas promotoras de todos los transcritos del genoma, tomando como puntos de referencia los sitios de inicio de la transcripción (Transcription Start Site, TSS) de todos los transcritos pertenecientes a genes codificantes, para a partir de ellos obtener una región comprendida desde 2.000 pares de bases dirección 5' y 500 pares de bases dirección 3' figura 34, que son las regiones canónicas donde se localizan las islas CpGs reguladoras de la expresión.

RESULTADOS

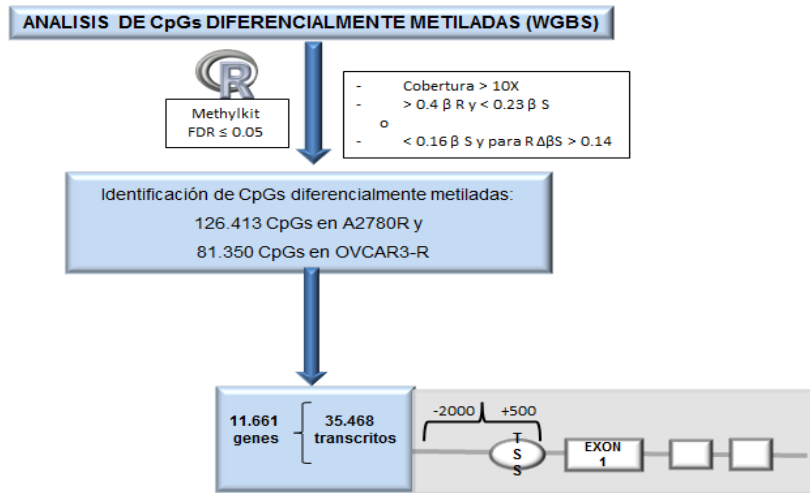


Figura 34. Identificación de dinucleótidos CpG diferencialmente metilados en resistencia vs sensibilidad en las líneas celulares de cáncer de ovario. El análisis bioinformático del metiloma empleó un FDR menor de 0,05. La implementación de nuevos valores β en lecturas con cobertura mayor de 10X permitió identificar posiciones metiladas de forma diferencial en los fenotipos resistentes. Estas posiciones metiladas fueron interrogadas regiones típicas promotoras.

5.2. Criterios para la selección de pacientes del TCGA.

Los criterios de selección de pacientes aplicados en este objetivo incluían el tratamiento con derivados de platino en todos los casos, existencia de datos de expresión y metilación originados del array 450K y RNA-seq respectivamente, y pacientes que hubiesen recurrido antes de 6 meses para ser considerados resistentes al tratamiento. A través de estos filtros se seleccionaron 35 pacientes, 11 resistentes y 24 sensibles con los que poder llevar a cabo nuestro estudio.

5.3. Análisis masivo del transcriptoma y metiloma en muestras congeladas de pacientes con carcinoma de ovario del H.U La Paz.

Para este segundo abordaje, se sumaron la determinación de los perfiles de metilación y de expresión a través la secuenciación masiva del transcriptoma por RNA-seq y los array de metilación de Illumina 450K muestras de origen fresco del Hospital Universitario La Paz. El array de metilación se llevó a cabo en 4 muestras tumorales y una de tejido de ovario normal. Para establecer correlaciones entre la expresión y la metilación se secuenció el transcriptoma de estas mismas muestras. Se realizó una nueva secuenciación del transcriptoma por RNA-seq en 5 muestras de tejido normal de trompa de Falopio y 8 muestras tumorales adicionales.

RESULTADOS

En una comparación preliminar de la metilación entre las muestras (3T, 5T, 6T y 8T) tumorales y el control (1N) se encontraron una alta similitud en el perfil de metilación que comparten la muestra control con la muestra tumoral 3T, figura 35. El análisis extrayendo esta muestra tumoral, identificó 6.421 posiciones CpG diferencialmente metiladas con un FDR menor de 0,1. En la figura 35 se muestra el histograma de metilación obtenido a través del array 450K.

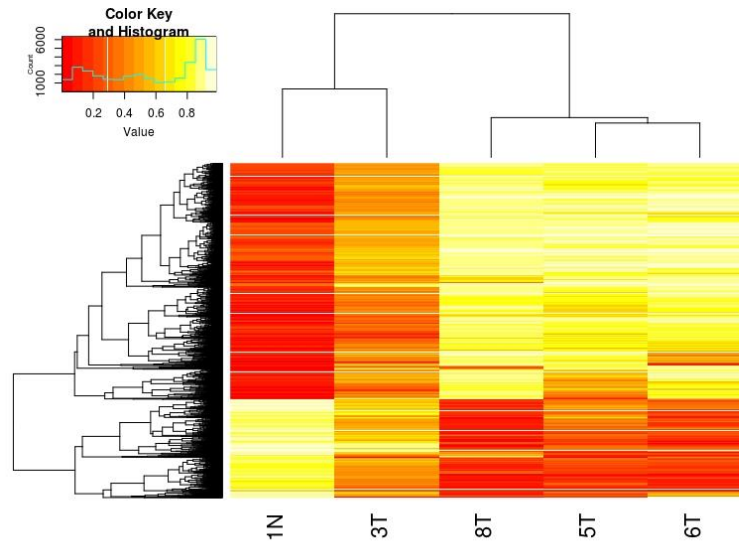


Figura 35. Mapa de calor de metilación del array 450K en 4 muestras tumorales y una muestra control no tumoral. Se analizó la metilación diferencial entre el control (tejido normal de ovario procedente de pacientes sometidas a cambio de sexo) y tumores frescos en más 450.000 posiciones CpG. En el recuadro se muestra el grado de metilación según el color, la metilación va acorde con valores cada vez mayores, por lo que los colores amarillos se relacionan con mayor grado de metilación global.

La secuenciación del transcriptoma de nuestras muestras fue realizada en servicios distintos, siendo la primera ronda de muestras (1N, 3T, 5T, 6T y 8T) secuenciadas en la Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), y la segunda (O714N, O715N, O716N, O720N, O721N, O568T, O569T, O571T, O572T, O705T, 10T, 11T y 12T) en Sistemas Genómicos. Las diferencias técnicas y biológicas de las muestras se normalizaron a través del Análisis de Componentes Principales (PCA) (Love et al., 2016), con el fin de tener certeza de la expresión diferencial hallada en los estudios posteriores. Estos análisis utilizan un parámetro denominado Biological Coefficient Variation (BCV) cuya estimación fiable es crucial para la determinación real de la diferencias de expresión génica del RNA-seq. De acuerdo a los PCA realizados se evidencian claramente tendencias de agrupación entre ellas. En la figura 36 se observa una población para las muestras tumorales O568T, O569T, O571T, O572T, O705T y otra para los tumores 10T, 5T, 6T, 11T, 12T y 8T. Al igual que lo observado

RESULTADOS

en el análisis de metilación, la muestra 3T también exhibe una variación biológica que la diferencia del resto de las muestras. Además, se observa dentro de estas poblaciones la tendencia de las muestras control a dispersarse del grupo tumoral, salvo por la muestra 1N, cuyo origen es tejido no tumoral de ovario en vez de trompa de Falopio sana.

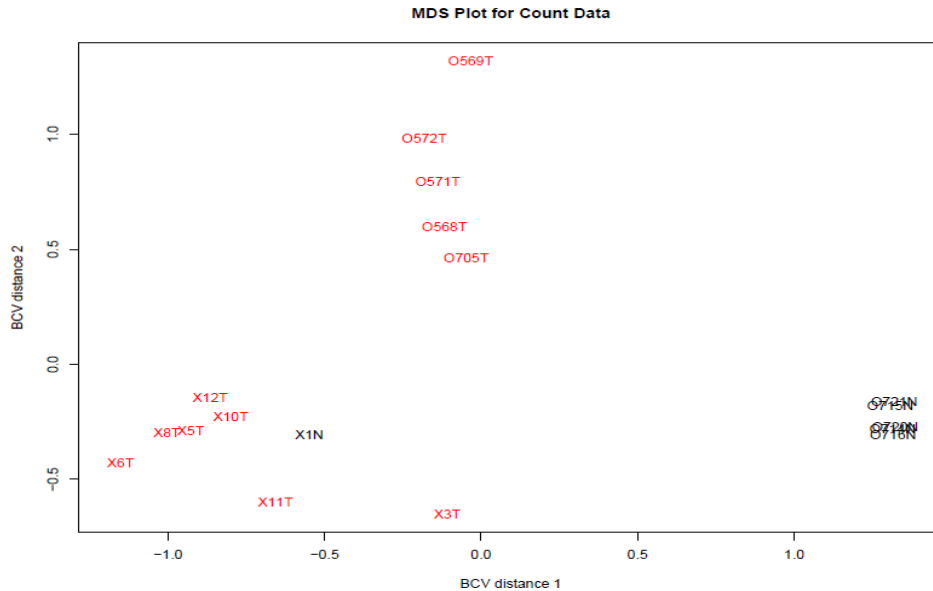


Figura 36. Análisis de Componentes Principales de Variabilidad Biológica. En esta figura se representan la agrupación de las muestras secuenciadas de acuerdo a su variabilidad biológica. Las muestras en rojo corresponden a los tumores secuenciados mientras que en negro se representan los controles normales (ovario normal y trompas de Falopio). Los ejes X e Y corresponden a las diferencias de los coeficientes de variación biológica de entre las muestras.

En la figura 37 se representa un Análisis de Componentes Principales basado en el perfil de expresión génica de las muestras a través del logaritmo del “Fold Change” o medida de los cambios de expresión. En este análisis se observa la tendencia de agrupación de las muestras tumorales y las muestras control en diferentes grupos.

RESULTADOS

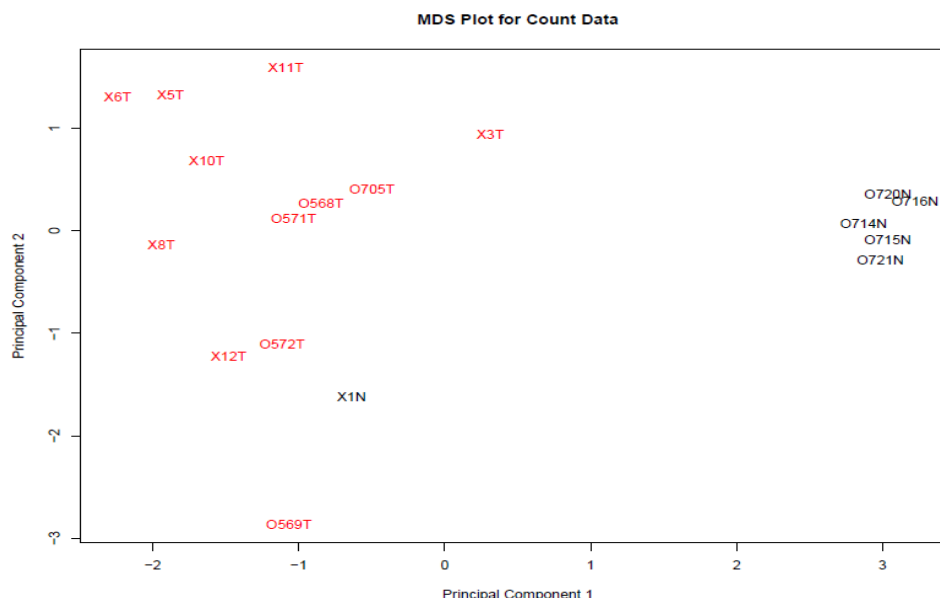


Figura 37. Análisis de Componentes Principales realizado sobre los resultados obtenidos de la secuenciación del transcriptoma. En esta figura se representa la agrupación de las muestras secuenciadas de acuerdo a la expresión génica. El eje X es la dirección que separa los datos de forma mayoritaria. El eje Y es la dirección que separa a los datos de forma secundaria.

5.4. Diseño experimental asociado al desarrollo del objetivo 2.

Se llevaron a cabo múltiples contrastes entre todas las metodologías con el fin de identificar genes relevantes basados en sus perfiles de metilación, expresión y su posible papel supresor, para ser parte de la matriz predictiva a terapia. En la tabla 12 se muestran los análisis aplicados, originando un total de 25 contrastes los cuales se detallan en los siguientes esquemas.

25 CONTRASTES							
WGBS	Microarrays de expresión	RNA- seq (logFC fdr <0,05)	RNA- seq (logFC fdr <0,05)	Array 450K (DeltaBeta fdr<0,1)	Array 450K (DeltaBeta fdr<0,1)	TCGA	TCGA
Genes con al menos una posición metilada en alguno de sus transcritos en RvsS en las dos líneas tumorales.	Expresión génica inhibida en RvsS en las dos líneas tumorales	Expresión génica inhibida en tumor	Expresión génica sobre-expresada en tumor	Hipermetilación en el tumor.	Hipometilación en el tumor.	Hipermetilación pacientes resistentes	Expresión génica inhibida en pacientes resistentes

Tabla 12. Análisis bioinformáticos realizados para establecer las bases del desarrollo de una matriz predictiva a platinos en cáncer de ovario. A partir del análisis de las diferentes metodologías y muestras utilizadas, se obtuvieron 25 análisis que enlazaron todas las alternativas posibles de búsqueda de genes relevantes que puedan hacer parte de una matriz de predicción a respuesta al tratamiento en CEO. Se describen los parámetros estadísticos tenidos en cuenta para cada análisis.

RESULTADOS

A continuación se detallan cada uno de los contrastes realizados agrupados de acuerdo a la implementación de las metodologías:

- **Grupo 1:** este grupo está conformado por la secuenciación masiva del metiloma (WGBS) y los microarrays de expresión más el estudio de los pacientes del TCGA.

A través del contraste A se obtuvieron 1.493 genes hipermetilados e inhibidos en su expresión en las líneas tumorales resistentes, de los cuales 139 poseen más de 10 posiciones CpG metiladas, tabla 13. Cuando se analizaron conjuntamente los modelos *in vitro* con la información de los pacientes del TCGA, se hallaron solo tres genes comunes entre pacientes y líneas celulares (figura 38b). Entre los 6 genes obtenidos en el análisis d, el gen *MEST* toma relevancia ya que también se identifica en 6 análisis posteriores.

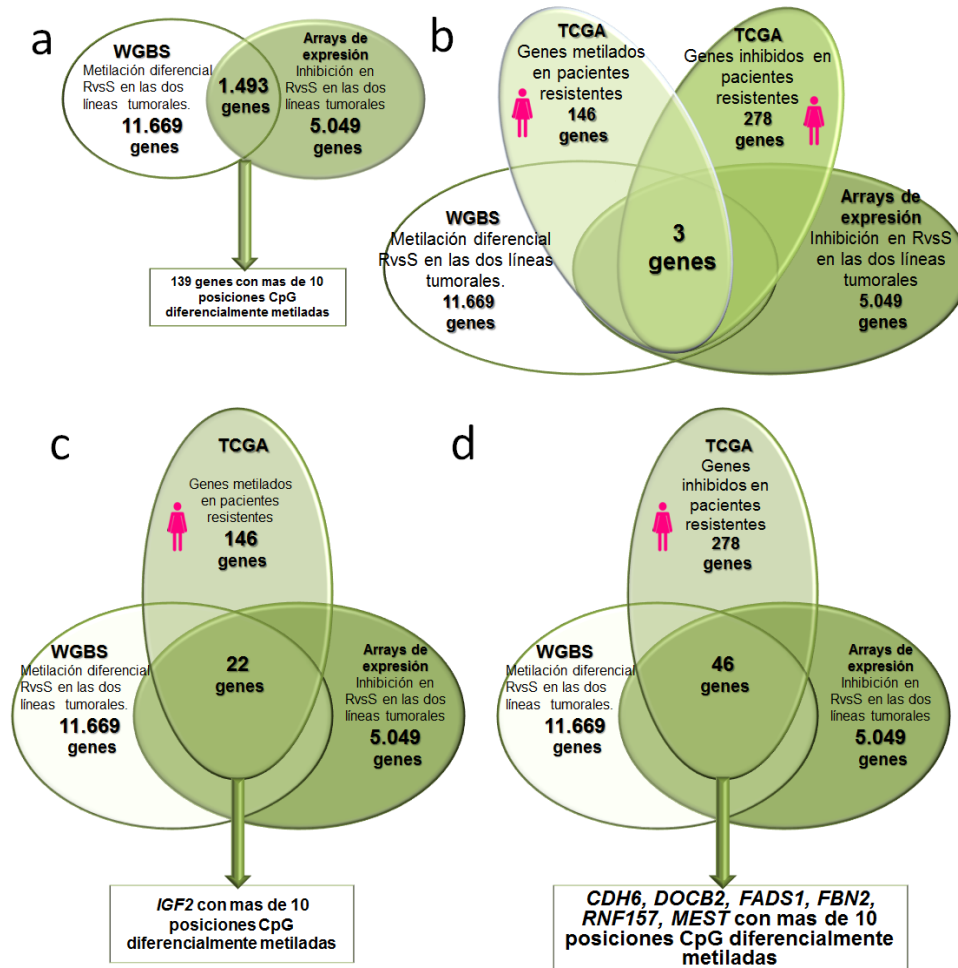


Figura 38. Contrastes del grupo 1. Los diagramas a, b, c y d muestran los resultados de los análisis hechos entre la secuenciación masiva del metiloma, los arrays de expresión de las líneas celulares y el TCGA.

RESULTADOS

ABCA7-002	CIRBP-018	FZD9-001	MAFG-002	PDE9A-026	SH3BP4-011	TSPAN4-010
ACOT11-003	CLUAP1-001	GALR2-001	MAP6D1-004	PDGFA-004	SHC3-001	TUBB3-001
ACSL4-009	COMP-005	GAST-017	MBP-004	PHLDB1-039	SLC27A6-002	VWCE-007
ADAL-001	CRABP2-001	GATA2-006	MEST-011	PIGL-016	SLC6A4-001	WFDC1-001
AEBP1-005	CTSF-002	GNAS-027	MMP14-007	PITX1-005	SLC7A10-002	WNT10A-001
AMMECR1-004	DAB2IP-003	GNG4-201	MN1-003	PPP1R3F-004	SLC9A3R2-004	WNT11-003
AMN-004	DOC2B-002	GPC1-008	MORC4-003	PRDM16-007	SLFN13-009	ZBTB46-001
AMN1-005	DYSF-002	GPR176-003	MXRA8-009	PRKCH-015	SSBP4-013	ZDHHC24-003
ANKRD45-002	ECEL1-003	GYLTL1B-004	NEBL-008	PTP4A2-007	ST6GALNAC2-007	ZFPM2-001
ATP10A-006	EHBP1L1-001	HS6ST2-201	NOX4-006	PTPN21-003	TBX1-004	ZMIZ1-002
BAI2-006	ESPN-201	IGF2-001	NRG1-002	PVRL3-003	TBXA2R-003	ZNF382-005
BRF1-007	FADS1-006	KCNA7-001	NRP1-001	PYDC1-002	TCEA2-010	ZNF418-002
BSG-008	FADS2-003	KCNC4-004	NTRK1-001	RAB11FIP4-001	TGFB1-001	ZNF490-004
BST2-004	FAM132A-001	KIF26A-001	P2RY2-002	RNF157-004	TIGD7-007	ZNF506-001
CABIN1-005	FAM19A5-001	KLHL13-001	PAX9-004	RTBDN-006	TMEM42-001	ZNF514-003
CALCA-002	FAM78A-001	L3MBTL4-006	PCBP3-001	S100A6-007	TNFRSF8-003	ZNF544-002
CBX8-003	FBN2-005	LAMA5-003	PCDH19-004	SAMD11-007	TP73-001	ZNF606-010
CCK-003	FBXL21-004	LAYN-008	PDE4A-003	SARM1-003	TPPP3-003	ZNF655-003
CDH6-001	FOXA1-201	LCMT2-201	PDE4D-019	SEMA6D-003	TRPC4-203	ZNF75A-002
CHRD-018	FZD7-001	LTBP2-003	PDE8B-001	SERTAD4-001	TRPM2-003	

Tabla 13. Genes resultantes del contraste A con más de 10 posiciones diferencialmente CpG metiladas. El gen PAX9 se ha resaltado pues es uno de los genes resultantes de los análisis realizados en el primer objetivo de nuestro trabajo. Los genes resaltados en verde son candidatos con más de 10 CpG metiladas originados de los contrastes c y d. En la tabla se muestran los transcritos mayormente metilado asociados.

- **Grupo 2:** este grupo está conformado por el análisis de metilación del 450K y RNA-seq de nuestros pacientes más el estudio de los pacientes del TCGA.

Este grupo lo conforman 8 contrastes basados en el estudio de los cambios en la expresión y presencia de metilación de nuestras cohortes frente a la información de pacientes del TCGA. En estos contrastes se ha tenido en cuenta tanto el estado de metilación de las muestras tumorales como el de la muestra control, y además se han incluido los genes sobre-expresados en los tumores. El número de genes comunes para cada contraste es bajo, lo que indica que los análisis con los datos del TCGA reduce el número de candidatos. En este segundo grupo de análisis el gen *MEST* se

RESULTADOS

identifica como un gen sobre-expresado en el tumor, hipermetilado en el control e inhibido en su expresión en los pacientes del TCGA, diagrama d, figura1 del Anexo I.

- **Grupo 3:** este grupo está conformado por la secuenciación masiva del metiloma, los microarrays de expresión, el análisis de metilación del 450K y RNA-seq de nuestros pacientes.

Los doce contrastes del grupo 3 se basan en la información asociada a los cambios en la expresión y presencia de metilación de los modelos *in vitro* y de las cohortes analizadas sin incluir la información del TCGA, figura 2 del Anexo I. Debido a esta exclusión se obtiene de forma general un número considerable de genes para cada contraste. De igual manera que en el grupo 2, en estos análisis también se ha valorado la hipometilación y la sobre-expresión en los tumores, haciendo que *MEST* sobresalga en 3 de los 12 contrastes. En los análisis de este grupo, *MEST* comparte lugar de aparición con otros genes de más de 10 posiciones metiladas, *CLUAP1*, *PITX1*, *FAM132A* y *TBX1*. Los genes *CLUAP1* y *TBX1* se encuentran metilados e inhibidos en las líneas tumorales resistentes y en los tumores de los pacientes. *PITX1*, *FAM132A* se comportan de igual manera a nivel *in vitro* que los demás pero en tumores de pacientes se encuentran sobre-expresados a pesar de estar metilados en el tumor. En las tablas 4 y 5 del Anexo I, se muestran los genes con más de 10 posiciones metiladas resultantes de los contrastes i y j.

En el último modelo de análisis de posibles candidatos a conformar la matriz predictiva, se conjugaron todas las metodologías, aquellas implementadas en el desarrollo del primer objetivo (WGBS, microarrays de expresión) y las nuevas técnicas de análisis masivo (RNA-seq y Array de metilación 450k), a excepción de la información de la base de datos (TCGA). El diseño de este último análisis permite contrastar de manera simultánea el modelo *in vitro* junto con el modelo traslacional, para así identificar genes que provienen de la unión y la intersección de los abordajes (i, j, k, del grupo 3, figura 2 Anexo I). De esta forma se obtuvieron 85 genes entre los cuales sobresalen nuevamente por el número de CpG metiladas *MEST*, *CLUAP1*, *PITX1*, *FAM132A* y *TBX1*, figura 39.

RESULTADOS

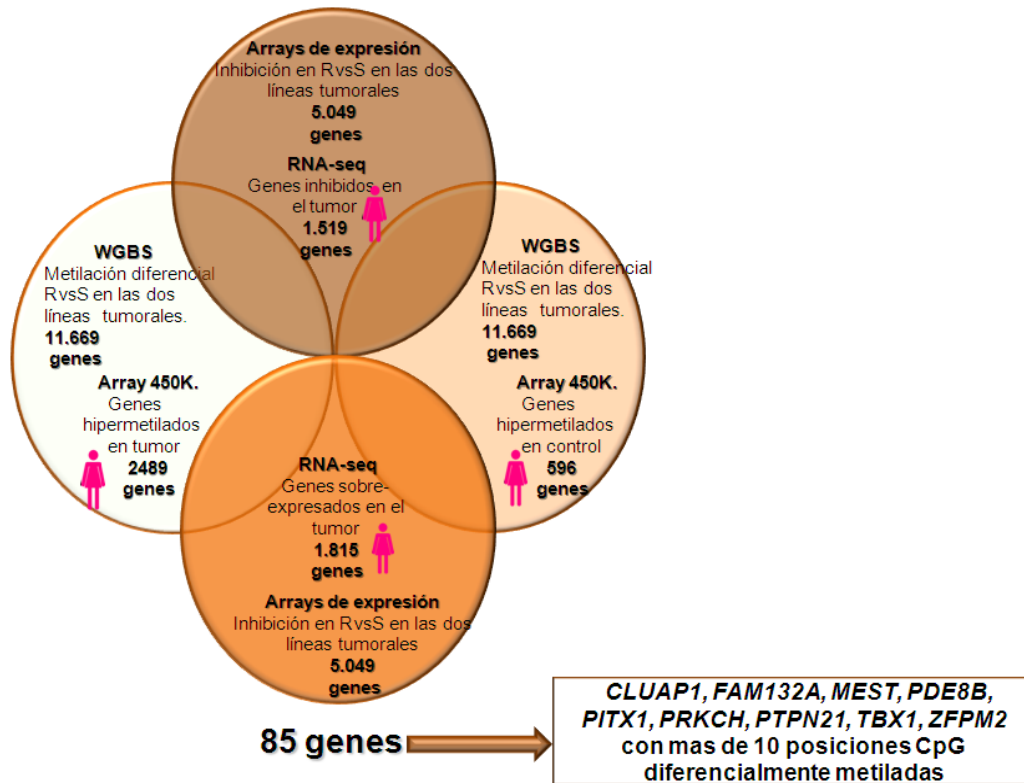


Figura 39. Análisis global. En este diagrama se esquematiza el contraste de todas las metodologías excepto la información procedente del TCGA.

6. *MEST* como posible biomarcador en resistencia al tratamiento con platinos en CEO.

En la serie de análisis realizados un grupo de genes se caracterizó por poseer más de 10 posiciones CpGs metiladas y por ser recurrentes en los resultados de diversos contrastes. Dentro de este grupo (*MEST*, *CLUAP1*, *PITX1*, *FAM132A* y *TBX1*), *MEST* es el gen que más frecuentemente se encuentra representado en los diferentes contrastes. Este gen se muestra metilado e inhibido en resistencia en el modelo experimental, inhibido en los pacientes resistentes del TCGA, hipometilado y sobre-expresado en los tumores de nuestras cohortes.

El gen *MEST* está compuesto por 13 transcritos codificantes de proteína y en él se han identificado dos regiones con alta densidad en posiciones CpGs cuya metilación pudiera estar regulando la expresión de estos transcritos (isla 1 e isla 2); sin embargo en nuestro estudio hemos hallado presencia de metilación diferencial exclusivamente en una región vinculada a la isla 2, figura 40. Esta región podría actuar como posible zona reguladora de la expresión de determinados transcritos del gen *MEST*, aunque

RESULTADOS

no se localice en la región promotora canónica. Esta isla 2 es de mayor extensión que la isla 1 y se ubica a 4.000 pb en dirección 3' de ésta, figura 40.

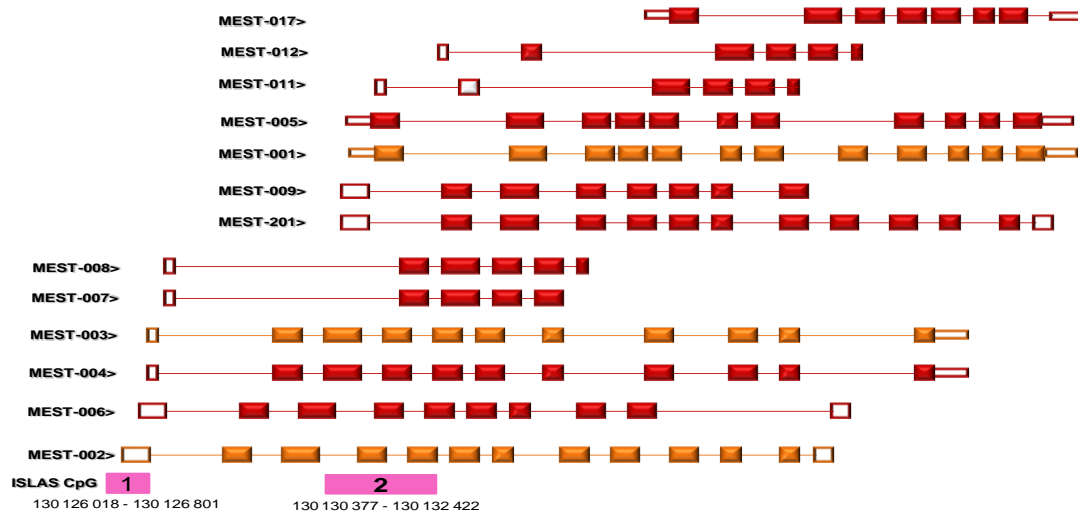


Figura 40. Gen *MEST*. En esta gráfica se representa la ubicación genómica de los transcritos de *MEST* y las dos islas CpG potencialmente reguladoras. La posición de la isla 1 se localiza en una típica zona promotora con capacidad para regular los transcritos más cercanos y posiblemente también los distantes. La segunda isla, que se encuentra ubicada internamente, podría encajar dentro de una región promotora para los transcritos 201, 9, 1, 5, 11 y 12, y posiblemente para el transcrito 17.

- Validación de la metilación de las islas CpG 1 y 2 de *MEST*.

***Área 1:** Cr 7: 130 126 018 - 130 126 801 identificada en la línea tumoral de cáncer de ovario resistente A2780, con una longitud de 793 pb. Para el análisis Sanger se secuenció una región de 529 pb.

A través de la secuenciación Sanger por bisulfito se identificó la metilación diferencial de la Isla CpG 1 en la línea tumoral resistente A2780-R y metilación en las muestras no tumorales (ovario normal, PBMCs) figura 41. También se observó hemi-metilación en todos los tumores analizados, excepto en la muestra 6T donde la señal de citosinas es muy débil, figura 41.

RESULTADOS

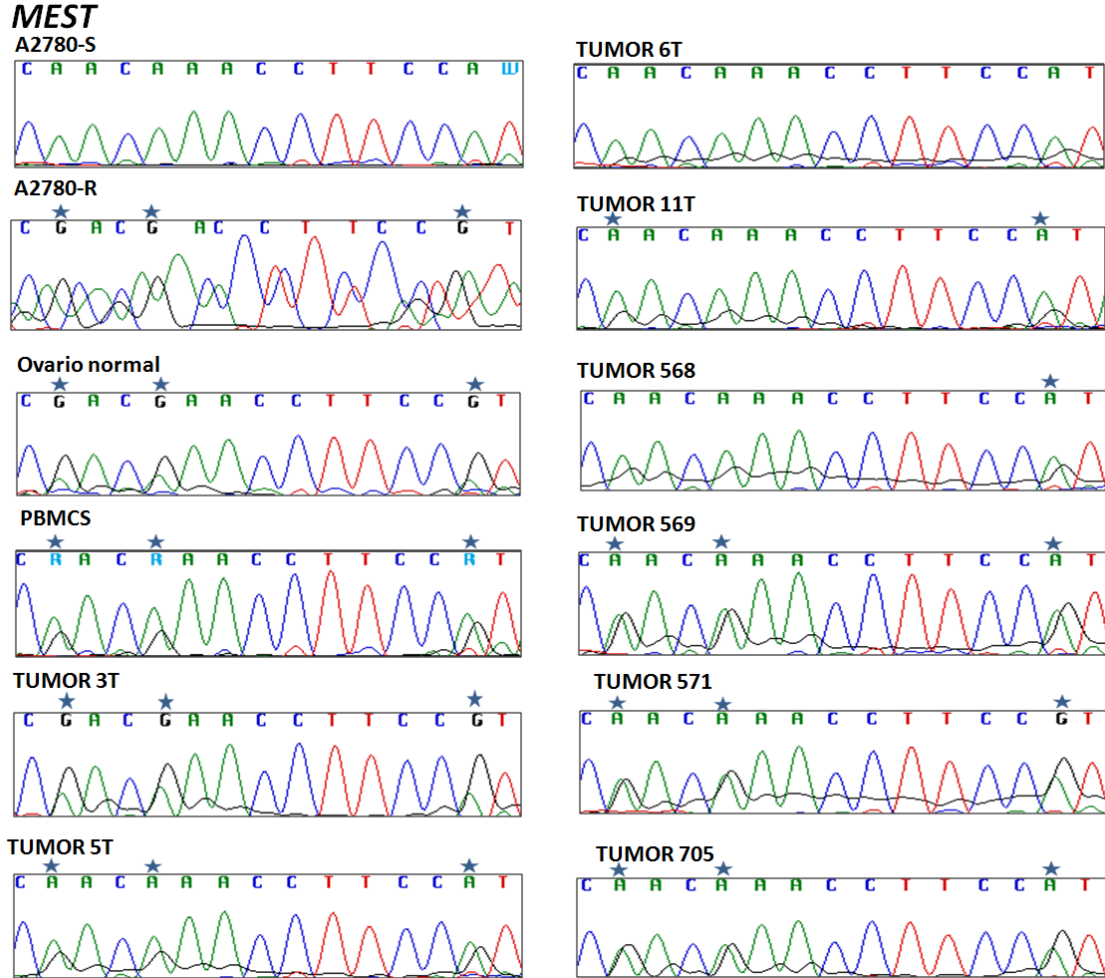


Figura 41. Isla 1 del gen *MEST*. Representación de un fragmento de secuencia del área del gen *MEST* de ADN modificado por bisulfito procedente de las líneas tumorales sensibles y resistentes A2780 , tejido normal de ovario procedente de pacientes sometidas a cambio de sexo, ADN de Células Mononucleadas de Sangre Periférica (PBMCS) y tumores procedentes de tejido fresco. Todas las muestras fueron secuenciadas con el cebador antisentido. Las posiciones metiladas se indican con un asterisco azul.

* **Area2** (región promotora diferencialmente metilada del transcrito 11) Cr7: 130 130 377- 130 132 422, identificada en la línea tumoral de cáncer de ovario resistente A2780 con una longitud de 2.045 pb con 96 posiciones CpG diferencialmente metiladas. Para validar esta región se seleccionó una región de 429 pb con 20 posiciones CpG para secuenciar.

A través de la secuenciación Sanger se validó la metilación diferencial de la Isla 2 en la línea tumoral resistente y también se identificaron posiciones CpG metiladas en las muestras control de ovario y trompa de Falopio. En todos los tumores analizados se detectó metilación en esta área, figura 42.

RESULTADOS

MUESTRA	ARRAY 450K (valor β)				TRÁNSCRITO DIFERENCIALMENTE EXPRESADO (conteo de transcritos por RNA-seq)	
	ISLA 1	SHORE 1	ISLA 2	SHORE 2	Área 1	Área 2
1N (OVARIO NORMAL)	0,31	0,46	0,70	0,53	MEST-002 MEST-003 MEST-004 MEST-006 MEST-007 MEST-008	MEST-001 MEST-005 MEST-009 MEST-011 MEST-012 MEST-201
3T	0,25	0,45	0,69	0,67	MEST-002 MEST-003 MEST-004 MEST-006 MEST-007 MEST-008	MEST-001 MEST-005 MEST-009 MEST-011 MEST-012 MEST-201
5T	0,07	0,57	0,40	0,45	MEST-002 MEST-003 MEST-004 MEST-006 MEST-007 MEST-008	MEST-001 MEST-005 MEST-009 MEST-011 MEST-012 MEST-201
6T	0,05	0,75	0,30	0,54	MEST-002 MEST-003 MEST-004 MEST-006 MEST-007 MEST-008	MEST-001 MEST-005 MEST-009 MEST-011 MEST-012 MEST-201
8T	0,04	0,87	0,54	0,77	MEST-002 MEST-003 MEST-004 MEST-006 MEST-007 MEST-008	MEST-001 MEST-005 MEST-009 MEST-011 MEST-012 MEST-201

Tabla 14. Contraste de metilación y expresión en las islas CpG de MEST. A través de los estudios masivos de metilación y expresión de 1 muestra control y 4 tumorales se analizó la relación entre la expresión de transcritos concretos y la metilación de las zonas que los regulan. El color azul representa hipermetilación y el color rojo hipometilación. Los transcritos inhibidos son representados en menor tamaño y los sobre-expresados en mayor tamaño.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Comparada con otras malignidades, el diagnóstico precoz del Cáncer Epitelial de Ovario (CEO) no ha mejorado en los últimos 30 años, situación que conduce a bajas expectativas de remisión y supervivencia. Las alteraciones epigenéticas descritas en el CEO relacionadas con la hipermetilación del ADN, están asociadas con la inactivación de casi todas las rutas involucradas en cáncer, incluyendo los mecanismos reparadores del ADN, la regulación del ciclo celular y apoptosis, entre otras. Se han hallado diversos grados de metilación en un número elevado de genes en CEO, pero pocos de ellos relacionados con la resistencia adquirida a platinos. Previamente en nuestro grupo se ha identificado el papel determinante de la hipermetilación del GST *IGFBP3* en la disminución de la sensibilidad a cisplatino en pacientes con cáncer de pulmón (De Caceres et al., 2010), otra malignidad de alta mortalidad asociada al fracaso del tratamiento con quimioterapia. Este trabajo se ha desarrollado en primer lugar a través de la caracterización epigenética como mecanismo de regulación génica en un modelo experimental generado en células tumorales resistentes a platino; y en segundo lugar a través de los datos ómicos obtenidos de muestras de pacientes del Sistema Sanitario y datos procedentes de bases de datos de acceso público. El abordaje general desarrollado en esta tesis sienta las bases para la futura selección de pacientes con mayor probabilidad de respuesta a platinos, optimizando el uso del tratamiento con quimioterapia.

1. Las líneas tumorales A2780 y OVCAR3 muestran una resistencia cruzada a los compuestos derivados del platino CBDCA y CDDP.

El carboplatino es un fármaco menos neuro, oto y nefrotóxico que el cisplatino debido a su farmacodinamia (Lokich and Anderson, 1998) aunque es menos potente, posiblemente por la menor tasa de formación de aductos de ADN. Estas diferencias en toxicidad se originan probablemente por la baja tasa de reactividad del CBDCA con los nucleófilos (Hah et al., 2006). En este trabajo realizamos diferentes ensayos de viabilidad para evaluar la respuesta de las líneas celulares hacia cada compuesto. La búsqueda de posibles biomarcadores en esta tesis se origina de nuestro modelo experimental *in vitro* conformado por las líneas tumorales sensibles y resistentes a platinos. Las pruebas de exposición cruzada demostraron la respuesta de las dos líneas tumorales a cada uno de los fármacos. Se necesitó incrementar las dosis de CBDCA entre 6 y 13 veces para producir la misma mortalidad que el CDDP en las mismas líneas, OVCAR3 y A2780, lo que probablemente se relacione con la mayor variabilidad observada en los IR en las líneas generadas resistentes a CBDCA. Por

DISCUSIÓN

ello, se seleccionaron las líneas resistentes al agente CDDP, cuyos IR fueron 2,2 y 2,3 para OVCAR3 y A2780 respectivamente, para los estudios realizados con los microarrays de expresión y la secuenciación masiva del metiloma. De este modo disminuíamos las variaciones intra-ensayo debidas a la diferente respuesta a carboplatino observada entre ambas líneas, y además podríamos esperar inicialmente eventos similares en supervivencia celular tras la exposición a cisplatino. Es interesante resaltar que hay diversos ensayos clínicos que han analizado el efecto de estos dos fármacos en diferentes malignidades, encontrando una mayor eficacia del CDDP en tumores de líneas germinales, vejiga, cabeza y cuello, mientras que en pulmón y ovario la efectividad entre los dos agentes es comparable (Lokich and Anderson, 1998, Saad et al., 2017). La similitud de ambos compuestos en cuanto a su efectividad en el tratamiento de cáncer de ovario, apoyó nuestra selección de líneas celulares resistentes a CDDP.

2. El efecto del CDDP influye en la expresión diferencial de un gran número de genes en las líneas tumorales resistentes a CDDP.

El análisis de expresión en nuestro modelo *in vitro* mostró que aproximadamente un 48% de los genes en las dos líneas estudiadas están diferencialmente expresados en los fenotipos resistentes. De los 9.736 genes diferencialmente expresados en nuestro modelo experimental, el 75% de ellos coincidía con los genes alterados en los datos obtenidos de pacientes incluidos en el TCGA. Se ha descrito que la metilación aberrante en las células expuestas constantemente a cisplatino puede afectar la sensibilidad de las células tumorales a los agentes antineoplásicos, alterando la expresión de genes cruciales en la respuesta a este fármaco (Chang et al.), lo que apoya el cambio observado en nuestro modelo experimental. De hecho, el elevado porcentaje de genes diferencialmente expresados coincidentes entre el modelo experimental de resistencia y las muestras de pacientes considerados como pobres respondedores, sugieren una similitud en la respuesta entre estos dos escenarios.

3. Optimización de las herramientas bioinformáticas para el análisis de la metilación en la secuenciación masiva del metiloma en líneas tumorales.

Para el análisis de la secuenciación masiva del metiloma por bisulfito existen diversos métodos bioinformáticos que permiten identificar posiciones diferencialmente

DISCUSIÓN

metiladas. Entre ellos están el test exacto de Fisher, algoritmos de los modelos de Markov, el programa Bisulfighter, el análisis Methypipe y la distribución beta binomial (Dolzhenko and Smith, 2014). Este último estima los niveles de metilación basado en el número de lecturas metiladas y no metiladas. Puesto que la metilación CpG es simétrica, este método analiza las observaciones de las citosinas en las dos cadenas de ADN.

En nuestros estudios empleamos este análisis binomial, el cual se deriva del método utilizado por Illumina en su array 27K y que se conoce como valor β (Bibikova et al., 2011). La validación de los valores β iniciales ($R > 0,7$ y $S < 0,3$), no identificó la presencia de metilación diferencial esperada en los primeros genes seleccionados con el fin de corroborar si estos parámetros escogidos con el apoyo de la bibliografía, se confirmaban en nuestro modelo experimental. A través de la secuenciación Sanger se identificó la ausencia de metilación en la línea resistente OVCAR3R en los genes *CDKND2* y *DCBLD2* y la presencia de metilación en el gen *SPHK1* tanto en la línea A2780 sensible como resistente. Estos resultados pueden deberse a los sesgos relacionados con el contenido de GC identificados en la amplificación de fragmentos por PCR en investigaciones que hacen uso de la secuenciación masiva (Benjamini and Speed, 2012). En las técnicas de cribado de alto rendimiento del ADN sin modificar por bisulfito han sido implementados diferentes métodos con el fin de solventar estos sesgos, pero no existe ningún algoritmo para compensar estos errores de forma específica en WGBS. Debido a que el ADN metilado posee un alto contenido de GC después de la conversión por bisulfito, puede presentarse una sobre-representación de moléculas metiladas en la construcción de las librerías. Esta sobre-representación parece ocasionarse por el alto número de ciclos empleados en la PCR y por el uso de ADN polimerasas no sensibles a uracilos en WGBS (Ji et al., 2014), lo que llevaría a la identificación virtual de potenciales candidatos metilados, que en realidad no presentarían esta alteración epigenética. Los primeros valores β utilizados sirvieron como precedente en el ajuste de unos nuevos que permitieran reducir el sesgo relacionado con el uso de la secuenciación masiva. Para minimizar esta posible sobre-representación de ADN metilado, disminuimos los valores β en sensibilidad a 0,2 y en resistencia a 0,4 para no descartar posiciones con metilación moderada.

4. La optimización de los valores β contribuyó a la identificación de genes con metilación diferencial en el modelo celular de resistencia a platino.

A partir de la búsqueda conjunta de genes diferencialmente expresados entre los pacientes seleccionados de la base de datos TCGA y nuestro modelo experimental en líneas celulares sensibles/resistentes a CDDP, identificamos un grupo de 29 genes bajo potencial regulación epigenética con islas CpG diferencialmente metiladas en diferentes áreas genómicas. Escogimos 4 genes candidatos que presentaban mayores grados de metilación para su validación mediante la secuenciación Sanger.

4.1. Los genes *FABP5* y *CFD* no están diferencialmente metilados.

Los cromatogramas obtenidos de la región amplificada del gen *FABP5* mostraron una aparente hemi-metilación en las dos líneas A2780, sensible y resistente. Las áreas densas en contenido GC como es el caso de regiones metiladas son complejas de amplificar debido a la formación de estructuras secundarias en el ADN, situación que conlleva en determinados casos a la aparición de señales confusas en los resultados de secuenciación. La ausencia de esta señal de citosinas en las demás líneas indica que existe un mayor grado de metilación en A2780, concretamente un escenario de hemi-metilación presente en los tipos celulares, situación que no permite validar la presencia de metilación diferencial entre ambas líneas para este gen.

La secuenciación de las dos áreas identificadas bajo potencial regulación epigenética en el gen *CFD* mostró una metilación basal de este gen en tres tipos de tejidos no tumorales y dos líneas celulares tumorales adicionales. La presencia de metilación basal independientemente de la respuesta a CDDP, conduciría a sesgos relacionados con la interpretación de los hallazgos en los estudios en el campo traslacional. Es interesante destacar que no se encontraron posiciones metiladas en el área 1 en A2780-R, y solo se identificaron dos posiciones metiladas en el área 2 en OVCAR3-R. Es bien sabido que el perfil de metilación en cáncer se caracteriza por una hipometilación global y una hipermetilación locus específica. Dependiendo del tipo tumoral, algunas regiones genómicas pueden encontrarse hiper o hipometiladas (Ehrlich, 2009). Por tanto, la hipometilación observada en las líneas A2780 y OVCAR3 puede asociarse a la demetilación general que acontece en cáncer. Además, el CEO es una de las malignidades en las que se ha demostrado una pérdida generalizada en metilcitosinas (Cheng et al., 1997, Ehrlich et al., 2006), hecho que podría explicar la presencia de metilación en los demás carcinomas analizados (cérvix, colon, próstata y epidermoide) y la ausencia en las líneas de carcinoma de ovario. La metilación basal

DISCUSIÓN

y la ausencia de metilación diferencial observada en *CFD* fueron dos factores determinantes para que este gen no fuese tenido en cuenta en estudios posteriores.

4.2. *PAX9* y *FKBP1B* presentan metilación específica en resistencia a platino.

El primer ajuste realizado en los parámetros de los valores β seleccionados, permitió lograr un 50% de éxito en la validación en los nuevos genes candidatos seleccionados. Esto indica que la implementación de estos parámetros condujo a la identificación de genes candidatos con presencia de metilación únicamente como consecuencia del tratamiento con cisplatino. La nueva selección de valores β mejoró ampliamente el ratio de hallazgos observado anteriormente.

La secuenciación Sanger de las regiones seleccionadas en los genes *PAX9* y *FKBP1B* validó la metilación diferencial observada en WGBS para ambos candidatos y corroboró nuestra metodología bioinformática basada en los valores β . Esta validación permitió además comprobar la ausencia de metilación en tejido normal, concediendo así más valor al posible papel como marcadores en resistencia para estos dos genes. Esta metilación se ratificó no solo mediante secuenciación Sanger, sino a través del análisis del estado de metilación de CpGs individuales y de la distribución de la metilación dentro de la región de interés en los dos genes. Estos hallazgos fueron comprobados también a través de la cuantificación absoluta de la metilación en cada línea tumoral para los dos genes. La diferencia entre los ratios de metilación R vs S para cada gen, indican que el efecto del cisplatino propició el doble de metilación en el gen *PAX9* en la línea OVCAR3-R comparado con la metilación de *FKBP1B* en este mismo grupo. El hecho de llegar a las mismas observaciones mediante tres técnicas diferentes proporciona mayor validez y peso a las aproximaciones bioinformáticas que implementamos en el análisis de la metilación diferencial de datos obtenidos por WGBS.

5. La inhibición transcripcional de los genes *PAX9* y *FKBP1B* en la línea celular OVCAR3R podría deberse a la hipermetilación de regiones “shore” e intragénicas respectivamente.

La estrategia usada en el objetivo 1 para la identificación de posibles genes bajo regulación epigenética, se centró en la búsqueda de correlación negativa entre la presencia de regiones metiladas en zonas concretas del genoma y la expresión génica. Se ha descrito extensamente la relación directa entre la hipermetilación de

DISCUSIÓN

regiones promotoras y el silenciamiento génico en cáncer (Herman and Baylin, 2003, Jones and Baylin, 2002) pero es de relativa novedad la asociación entre la regulación de la expresión génica y la metilación de regiones ubicadas distalmente de las clásicas islas CpG. Menos común es la interrogación de la metilación en zonas intragénicas y su asociación con la regulación de la expresión (Jones, 2012) .

La metilación diferencial de *PAX9* fue identificada y cuantificada en una región ubicada a 4kb en dirección 5' de su región promotora. Observamos una correlación inversa entre el grado de metilación y los niveles de expresión en los diferentes grupos experimentales. Los menores niveles de expresión se observaron en OVCA3-R donde este gen se encuentra hipermetilado, y su expresión se re-estableció significativamente y de modo simultáneo a la disminución del grado de metilación en el grupo OVCAR3-RT. Los hallazgos obtenidos en el estudio del gen *PAX9* podrían indicar la influencia de la hipermetilación en zonas distantes de regiones promotoras sobre la regulación génica en líneas celulares tumorales. Sin embargo, esta relación no se confirmó al extender el análisis a las muestras de los pacientes, pues no se observó la tendencia esperada ni en nuestra cohorte de pacientes ni en la información extraída del TCGA. *PAX9* pertenece a una familia de factores de transcripción que actúan como genes de control maestro en el desarrollo celular por lo que de manera general su expresión en la etapa adulta esta disminuida (Stapleton et al., 1993). Al ser un factor de transcripción está regulado por estrictos patrones espaciales y temporales y es probable que los demás actores que conforman el escenario epigenético tengan mayor relevancia en el control de la transcripción que la metilación del ADN, como el papel de las histonas, las proteínas de unión al ADN metilado o los diferentes tipos de ARN no codificantes, al menos en tumores de pacientes.

En el caso del gen *FKBP1B*, la región identificada se encuentra ubicada en el cuerpo del gen. Al igual que *PAX9*, los análisis cuantitativos sobre el estado de metilación del gen *FKBP1B* evidencian una correlación metilación y su expresión. Comparado con el gen *PAX9*, los niveles de metilación en OVCAR3-R del gen *FKBP1B* son más elevados. Estas diferencias en la metilación podrían explicar la efectividad reducida del tratamiento epigenético sobre *FKBP1B* comparado con *PAX9* respecto a la disminución de la metilación en OVCAR3-RT. La discreta disminución en la metilación de *FKBP1B* no afectó su transcripción, pues los niveles de expresión son más elevados que los de *PAX9* en el grupo experimental tratado. Los agentes demetilantes del ADN no muestran especificidad en su actividad efectora, pero su cinética depende de la localización de las posiciones CpG dentro de la unidad

DISCUSIÓN

transcripcional (Yang et al., 2014), lo que podría explicar la diferencias en la demetilación entre los dos genes. La diferente ubicación genómica de las áreas metiladas también puede influir en las diferenciales transcripcionales observadas. Las regiones ubicadas en el cuerpo del gen abarcan elementos funcionales como promotores alternativos, “enhancers”, sitios de unión de factores de transcripción y uniones exón-intrón ricas en nucleosomas. La mayoría de estos elementos se encuentran estabilizados por la metilación del ADN por lo que su hipometilación mediante agentes farmacológicos puede afectar en mayor medida la re-expresión génica, situación que podría representar el caso de *FKBP1B*. Diversos estudios sugieren que la metilación del ADN en el cuerpo del gen puede incrementar la actividad transcripcional bloqueando la iniciación de promotores intragénicos (Maunakea et al., 2010). Sin embargo, otros trabajos han descrito relaciones inversas entre la expresión y la metilación originada en exones e intrones (Li et al., 2003, Ortmann et al., 2008). Zhang et al. demostraron que *PMP24*, un gen supresor tumoral, es silenciado en líneas tumorales de cáncer de próstata a través de la metilación de una isla CpG que abarca parte del promotor, el exón 1 y parte del primer intrón (Zhang et al., 2010). Este hallazgo es similar al comportamiento epigenético y transcripcional que hemos identificado en el gen *FKBP1B* en cáncer de ovario, incluso en relación a la isla CpG estudiada, pues aunque la región diferencialmente metilada se encuentra específicamente en el intrón 1, esta forma parte de una isla más grande que encierra al exón 1 y al promotor del gen. El silenciamiento génico de *FKBP1B* y su potencial relación con la presencia de metilación en dicha región intrónica se verificó en los pacientes evaluados en nuestras cohortes y procedentes de la base de datos TCGA, con valores estadísticamente significativos en nuestros pacientes.

6. Papel de los genes *PAX9* y *FKBP1B* como posibles genes supresores tumorales.

Acorde a la hipótesis de nuestro trabajo, los potenciales candidatos además de estar regulados epigenéticamente, deben exhibir un papel biológico trascendente en relación al aumento en la eficacia del tratamiento CDDP.

6.1. *FKBP1B* media la sensibilidad al agente CDDP en la línea celular OVCAR3.

La expresión exógena del gen *FKBP1B* en el grupo experimental OVCAR3-R, en el que dicho gen está inhibido y metilado, indujo un claro descenso en la supervivencia celular tras el tratamiento con cisplatino. Este aumento en la respuesta al tratamiento

DISCUSIÓN

en las células OVCAR3-R transfectadas con el ADNc del gen *FKBP1B* se asemeja al observado en la línea tumoral sensible a CDDP, pues se logró la muerte del 50% de las células con dosis similares de CDDP en los dos grupos. La sobre-expresión de *PAX9* no indujo efecto alguno en la supervivencia celular en respuesta al tratamiento, de hecho, se observa un comportamiento similar entre las células transfectadas con este gen y el grupo control no transfectado. Es de destacar que los resultados obtenidos con *PAX9* no están relacionados con una posible transfección deficiente, pues el experimento control que valora la cantidad de ARN mensajero evidenció niveles de expresión elevados de *PAX9* a las 24 y 72 horas tras la transfección, incluso más altos que los del gen *FKBP1B*. El mantenimiento de la sobre-expresión a las 72 horas es un hecho determinante en este tipo de experimentos, pues la supervivencia en las curvas de viabilidad es analizada a las 72 horas de haber sido tratadas y la estabilidad de la sobre-expresión es clave para poder validar la relación causa efecto. Sin embargo, los niveles de expresión del gen *PAX9* a las 24 y 72 horas, indican que la transfección no mantuvo la misma efectividad a las 72 horas, lo que pudiera estar influyendo en el resultado obtenido en los análisis de viabilidad a cisplatino. Estas observaciones también reflejan que la discreta sobre-expresión de *FKBP1B* en las células R fue suficiente para producir el efecto biológico deseado. Los resultados observados para *PAX9* orientan a realizar experimentos adicionales con condiciones de transfección diferentes, como el aumento en las concentraciones de los plásmidos o establecer una transfección estable mediante el uso de lentivirus.

6.2. La metilación y expresión del gen *PAX9* influyen en la respuesta al tratamiento con platino en pacientes con CEO.

El estudio de presencia de metilación y los cambios en la expresión de los dos genes candidatos en las muestras congeladas obtenidas de pacientes con cáncer de ovario, evidenciaron resultados significativos relacionados con la metilación del gen *PAX9* sobre la supervivencia global. La mayor frecuencia de metilación del gen *PAX9* en muestras frescas comparada con los tumores procedentes de parafina, indica que el tipo de muestra puede tener influencia en la discrepancia de los resultados estadísticos entre las diferentes cohortes. El ADN procedente de parafina se encuentra más fragmentado que en el tejido fresco, de hecho, los cortes pertenecientes al grupo de pacientes procedentes del biobanco del CNIO solo tenían 5 micras de grosor, cuando para este tipo de determinaciones es aconsejable un corte de 10 micras, lo que disminuye la integridad del ADN. Por tanto, el éxito en la amplificación de este tipo de muestras queda comprometido. Además de contemplar la causa técnica de estas

DISCUSIÓN

diferencias, también se compararon los diferentes parámetros clínicos obtenidos en cada cohorte para identificar factores que pudiesen ser los causantes de la disparidad en los resultados, sin embargo, no se encontraron diferencias en este sentido.

Los análisis bioestadísticos mostraron que la metilación de *PAX9* influye significativamente en la supervivencia global de los pacientes de cohortes de muestras frescas. Los pacientes con presencia de metilación en el gen *PAX9* tienen una supervivencia menor que los que no presentan metilación; esta misma asociación fue identificada en el grupo de pacientes resistentes al tratamiento con platino. La supervivencia global es considerada como la variable de mayor confianza e interés cuando se desea analizar el efecto de una intervención (Lloyd et al., 2015). Estos resultados van en consonancia con el objetivo planteado en nuestra búsqueda pero existe un factor que interfiere con estos hallazgos. A pesar de que en las muestras procedentes de pacientes la frecuencia de metilación del gen *PAX9* es mayor que la de *FKBP1B*, la correlación negativa entre metilación y expresión de *PAX9* solo ha podido demostrarse en el modelo celular. Según este escenario, la metilación de este gen podría estar condicionando la respuesta al tratamiento, pero su expresión no parece estar regulada directamente por la metilación. Sin embargo, a través de los análisis de supervivencia *in silico* utilizando los datos de las bases públicas TCGA y GEO, que permite incrementar el estudio de expresión a más de 1.200 pacientes, observamos que la expresión de *PAX9* sí que parece estar influyendo en la progresión de la enfermedad, pues los pacientes que expresan niveles bajos del gen recaen antes que aquellos con expresión elevada. Estos hallazgos confirman que *PAX9* presenta el perfil deseado como biomarcador de respuesta en pacientes, pero que su mecanismo de regulación génica debe ser estudiado más en profundidad.

6.3. *FKBP1B* como posible biomarcador de resistencia en pacientes con CEO.

Además de exhibir un papel como GST *in vitro*, el perfil transcripcional de *FKBP1B* tanto en nuestra cohorte como en los pacientes del TCGA podría ser el indicado según los resultados obtenidos. Los análisis de supervivencia realizados para *FKBP1B* en los pacientes con tumores frescos se asemejaron a los resultados obtenidos con el gen *PAX9*, pero con ausencia de significación estadística, debido probablemente al bajo número de pacientes con presencia de metilación (4 de 49). Existen estudios que plantean una posible relación entre la baja frecuencia de mutación de conocidos oncogenes como *KRAS* (<10%) y la respuesta al tratamiento en cáncer de colon (Tougeron et al., 2013). Es probable que esta situación ocurra para *FKBP1B* y que el

aumento del tamaño muestral de pacientes conduzca a la identificación de un papel traslacional de este gen similar al observado en el gen *PAX9*.

7. Papel biológico de *PAX9* y *FKBP1B* en cáncer.

A través de la suma de todos los estudios *in vitro*, *in silico* y traslacionales realizados, se propone que estos dos genes podrían estar actuando como supresores tumorales en CEO y que su papel biológico podría favorecer la sensibilidad hacia determinados fármacos.

7.1 Genes *PAX*.

Los genes *PAX* (Paired Box) están conformados por 9 miembros y codifican para factores de transcripción que contienen un dominio de unión a ADN altamente conservado llamado “paired domain”. (Blake and Ziman, 2014). Estos genes son reguladores del desarrollo de tejidos y la diferenciación celular en el embrión y pueden re-expresarse en algunos tejidos en la edad adulta. Los mecanismos que controlan estos genes son esenciales para prevenir la expansión de las poblaciones de células con capacidad de auto-renovación que surgen durante el desarrollo embrionario y que mantienen el potencial de proliferar rápidamente, migrar y transdiferenciarse. Dentro de los procesos clave que regulan estos genes se encuentra la proliferación, la resistencia a la apoptosis, y la migración e invasión celular (Blake and Ziman, 2014). La expresión de los genes *PAX1*, *PAX4*, *PAX6* y *PAX9* está menos relacionada con cáncer e incluso su expresión es indicativa de pronóstico favorable, como se ha observado con *PAX6* y *PAX9* (Robson et al., 2006). Hasta la fecha solo hay un estudio que relacione la inhibición de la expresión del gen *PAX9* y la aparición de cáncer en la mayoría de los carcinomas invasivos de esófago comparado con el epitelio normal, asignando a este gen un papel positivo como marcador en la desregulación (Gerber et al., 2002). No hay suficiente evidencia sobre la actividad anti-oncogénica del gen *PAX9* y mucho menos su implicación en resistencia por lo que podría ser un nuevo biomarcador en CEO.

7.2 Inmunofilinas.

Las proteínas de unión a FK506 (FKBP's) o inmunofilinas son los ligandos intracelulares de FK506 y rapamicina, dos compuestos naturales con actividad inmunosupresora. Esta familia de proteínas incluye los miembros FKBP12, 12.6 (FKBP1B), 13, 25, 30, 51, y 52, y están involucrados en la liberación intracelular del calcio, la transcripción génica, la traducción de proteínas y el tráfico celular (Harrar et

al., 2001). La rapamicina y sus derivados se han usado con éxito en una amplia variedad de tumores. FKBP12 es la proteína más pequeña de la familia y forma complejos de unión con la rapamicina y FK506. Estos complejos interfieren o regulan vías de señalización celular, entre ellas mTOR (mammalian target of rapamycin) (Jacinto and Hall, 2003). La hiperactivación de mTOR, juega un papel en la transformación tumoral y el crecimiento. Se creía que solo FKBP12 actuaba como ligando entre rapamicina/FK506 y mTOR, pero se ha identificado a FKBP1B como otro mediador en esta unión, y por tanto con capacidad para inhibir la actividad quinasa de mTOR (Lam et al., 1995). Diversos estudios han mostrado la relación de ciertas inmunofilinas con la respuesta a tratamiento en cáncer. Liu *et al.* han demostrado que la proteína FKBP12 promueve la degradación de la proteína oncogénica MDM2 a través de su auto-ubiquitinación, favoreciendo el aumento la eficacia de la dexorrubicina en líneas tumorales de neuroblastoma (Liu et al., 2016). También se ha descrito que la inhibición de la expresión de la proteína FKBP51 conduce al aumento de la resistencia en la quimioterapia de varias líneas celulares tumorales. FKBP51 actúa como mediador en la actividad fosfatasa que PHHPL ejerce sobre Akt (Pei et al., 2009). Al igual que el gen *PAX9*, no existe evidencia concreta hasta el momento de la implicación de *FKBP1B* en resistencia en alguna malignidad.

8. Establecimiento de la base epigenética para el desarrollo de una Matriz predictiva de resistencia a terapia en CEO.

Entre 1971 y 2007 se ha conseguido un incremento en la supervivencia de solo un 17% en cáncer de ovario (Lloyd et al., 2015), mientras que en el cáncer de mama se ha conseguido un incremento del 38% en la supervivencia a 10 años. Son muy pocos los marcadores identificados y llevados a la clínica en CEO. Las herramientas basadas en la expresión génica para la identificación de factores pronóstico y predictivos en pacientes después de la cirugía o quimioterapia solo están disponibles para ciertos tipos tumorales. Entre ellos están el Mamaprint que predice la probabilidad de metástasis en mama (Slodkowska and Ross, 2009) y el Oncotype DX que predice recurrencia después del tratamiento en el caso de cáncer de colon (Clark-Langone et al., 2010), mama (Cronin et al., 2007) y próstata (Karthi et al., 2014). Actualmente no existe este tipo de herramientas en el CEO que contribuyan a predecir la sensibilidad o resistencia hacia la quimioterapia.

DISCUSIÓN

8.1. Identificación de la metilación diferencial de los diferentes transcritos del genoma en nuestro modelo experimental.

La modificación de los valores β iniciales permitió alcanzar un 50% de éxito en la identificación de posibles biomarcadores. Los resultados previos nos permitieron ajustar de nuevo estos parámetros para alcanzar mayor éxito en el desarrollo de este segundo objetivo. Consideramos disminuir el valor β a 0,16 en S, lo que permitiría descartar cualquier grado de metilación basal en sensibilidad, y además se introdujo un diferencial de 0,14 entre las células sensibles y resistentes, lo que podría traducirse en la identificación de regiones con posiciones CpG moderadamente metiladas que también pueden ser determinantes en regular la expresión génica.

El abordaje bioinformático en este objetivo estuvo enfocado en zonas promotoras típicas de todos los transcritos codificantes de un gen. La región seleccionada comprendió entre 2.000 pb en dirección 5' y 500 pb en dirección 3' del TSS. Se tuvo en cuenta que para transcritos más pequeños cuyo TSS está interno con respecto a transcritos más largos del mismo gen, puede ocurrir que la zona comprendida entre -2.000 y +500 del TSS no sea la zona promotora correspondiente para transcribir dicho transcrito, sino que la regulación provenga de la región -2.000 +500 del transcrito mayoritario donde esté incluido. Esta minuciosa búsqueda permitió conocer el estado de metilación de cada transcrito codificante e identificar aquellos mayoritariamente metilados con el fin de identificar el transcrito clave que confiera a la célula la capacidad de resistencia debido al control epigenético de su expresión.

8.2. Identificación de una “firma” epigenética en resistencia.

El desarrollo de este trabajo se fundamentó en los datos obtenidos a partir de la secuenciación del metiloma y los microarrays de expresión realizados en nuestro modelo experimental. A partir de estas metodologías se originaron dos diseños prioritarios para desempeñar los objetivos propuestos. En el desarrollo del segundo objetivo se buscó la interpolación de la metilación y expresión diferencial identificada en las líneas celulares resistentes a cisplatino con los resultados del análisis de la presencia de metilación y expresión identificada en los tumores de pacientes procedentes de nuestras cohortes y de la base de datos TCGA. Partimos de la expresión diferencial observada en las líneas celulares resistentes y esta se interrogó en los resultados obtenidos del RNA-seq de un número limitado de muestras frescas obtenidas de pacientes del Hospital La Paz. A su vez, también se estudiaron en las

DISCUSIÓN

muestras del TCGA que también se habían sometido a la técnica RNA-seq y no de microarrays de expresión.

Sometimos estos datos a todas las posibles comparaciones, para simular de este modo los potenciales resultados que podrían derivarse del funcionamiento “*in silico*” de una matriz que se enriquezca constantemente. De acuerdo a la metodología utilizada y el tipo de muestra analizada, los resultados obtenidos de las comparaciones realizadas son el reflejo de dos escenarios. Por una parte, la metilación y expresión diferencial identificada en las líneas celulares resistentes (modelo celular) y por otra, la metilación y expresión diferencial identificada en muestras tumorales (modelo traslacional). Con el propósito de no omitir posibles candidatos, la búsqueda de marcadores también integró genes con sobre-expresión e hipometilación en los tumores de pacientes, pues dentro de estos grupos podrían encontrarse genes que pueden asemejarse al perfil buscado en resistencia, como potenciales oncogenes. En la figura 43 se representan los diferentes escenarios que pueden ocurrir en la búsqueda de genes candidatos a nivel traslacional. El escenario A+B explica por qué genes sobre-expresados e hipometilados en muestras tumorales respecto a tejido no tumoral pueden ser relevantes. Los candidatos que exhiben una menor expresión en R (B, D, G) respecto otro grupo de genes (A, F, P) en S, pueden correlacionarse con una hipometilación en S (valores β menores) o una hipermetilación en R. La combinación C+D representa el perfil deseado, mientras que el caso A+D explicaría a los genes sobre-expresados e hipermetilados. Dentro de este grupo hay candidatos que exhiben una menor expresión (B, D, G) y una mayor metilación en (A, F, P). La unión C+B abarca aquellos genes inhibidos e hipometilados. En este grupo hay candidatos que exhiben una menor expresión (B, D, G) y una mayor metilación en el tumor (A, F, P) que también puede ser de interés al estar orientados hacia el perfil buscado en resistencia.

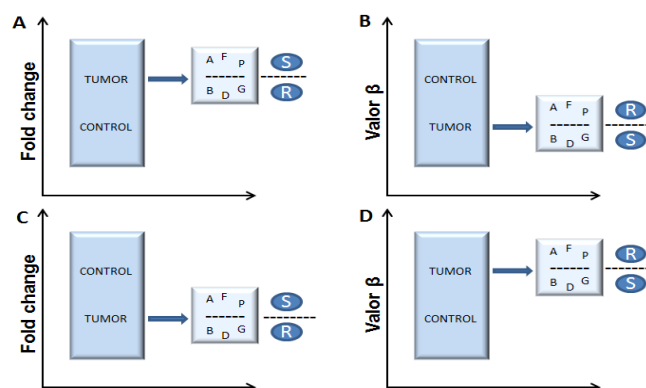


Figura 43. Escenarios de metilación y expresión en la búsqueda de genes candidatos a nivel traslacional. El caso (A/B) representa genes sobre-expresados e hipometilados en tumores de pacientes. El caso (C/D) representa los casos convencionales de inhibición de expresión e hipermetilación en el tumor. El caso (A/D) representa aquellos genes sobre-expresados e hipermetilados mientras que (C/B) aquellos genes inhibidos e hipometilados.

Los análisis que permiten tener más certeza en la extrapolación de los hallazgos traslacionales son aquellos que involucran a WGBS y los arrays de expresión, pues a través de estas aproximaciones se identificaron candidatos hipermetilados e inhibidos en resistencia comunes a aquellos genes resultantes de cada uno de los escenarios anteriormente descritos.

Identificamos un grupo de 5 genes (*MEST*, *CLUAP1*, *PITX1*, *FAM132A* y *TBX1*) con más de 10 CpGs metiladas resultantes de varios contrastes y del diseño final que engloba todas las metodologías. Entre ellos escogimos el gen *MEST* para confirmar nuestros hallazgos, ya que se ha descrito su papel predictivo en CEO, pues se ha encontrado metilado en tumores de pacientes que recaen, los cuales no mostraban metilación en el momento de iniciar el tratamiento (Zeller et al., 2012).

9. Nueva región reguladora del transcrito *MEST-001*.

La validación a través de la secuenciación Sanger permitió comprobar la certeza de los valores β seleccionados para este segundo objetivo, pues no se observó metilación en el fenotipo sensible de la línea A2780 y si en su línea parental resistente. Zeller *et al.* hallaron metilación diferencial en esta misma línea pero en una región diferente y además demostraron la re-expresión de este gen mediante tratamiento epigenético, evidenciando el mecanismo de regulación (Zeller et al., 2012). Estos antecedentes reforzaron la dirección y los abordajes que empleamos en nuestra búsqueda de candidatos.

DISCUSIÓN

MEST es un gen que está regulado por impronta genética. La desregulación de la metilación y/o expresión de este gen ha sido asociada con cáncer invasivo de mama (Pedersen et al., 1999), cáncer invasivo de cérvix (Vidal et al., 2014) y en el desarrollo de adenocarcinoma de pulmón (Kohda et al., 2001). La impronta puede ejercer una regulación promotor-específica, como se ha descrito para el gen *IGF-2*, en donde en ciertos tejidos el transcrito del promotor P1 se origina siempre del alelo materno y paterno, mientras que los transcritos de otros promotores (P2-P4) proceden exclusivamente del alelo paterno (Vu and Hoffman, 1994). Pedersen et al. observaron que el transcrito 1 de *MEST* se encuentra bajo impronta tanto en muestras control como en tejido tumoral cáncer invasivo de mama manteniendo así su expresión mono-alélica, mientras que el transcrito 2 está bi-alélicamente expresado en la mayoría de los tumores (Pedersen et al., 2002). Con el fin de conocer los mecanismos de expresión diferencial de *MEST* en nuestro trabajo, comparamos la metilación tanto en islas y regiones “shore” del área encontrada en nuestro estudio, con la otra región ya mencionada descrita en resistencia a CDDP en líneas tumorales y pacientes (Zeller et al., 2012). La inhibición de MEST-001 en la mitad de los tumores analizados coincide con la metilación diferencial observada en la región “shore” 2, reflejo de la expresión mono-alélica de este transcrito, relacionada posiblemente con el mantenimiento de la impronta en esta área. Por otro lado, encontramos una sobre-expresión de MEST-006 en la mitad de tumores analizados, que concuerda con la disminución en la metilación identificada en la isla 1 comparada con el control, la cual podría deberse a una pérdida de impronta. Los efectos de estos mecanismos en *MEST* solo han sido relacionados con la biología de algunos tumores pero hasta ahora ningún estudio ha evaluado su relación con la resistencia al tratamiento. Nuestros resultados proponen que la inhibición del transcrito MEST-001 puede estar relacionada con la respuesta a la quimioterapia y que la regulación de este transcrito podría estar asociada al equilibrio de la metilación de la región estudiada en nuestro trabajo.

Este trabajo evidencia la necesidad del estudio transcrito-específico en los diferentes candidatos génicos que pudieran estar bajo regulación epigenética, lo que favorecería la identificación de nuevos marcadores con un papel específico en la respuesta terapéutica a platino. Sería de esperar que el propio enriquecimiento de la matriz predictiva llegara a este grado de sensibilidad, proporcionando candidatos únicos a nivel de transcrito que finalmente pudieran aportar información clínica valiosa para predecir la evolución y posible respuesta terapéutica en cada paciente.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) El modelo experimental generado en nuestro laboratorio, basado en el establecimiento de líneas celulares resistentes al agente cisplatino a partir de líneas comerciales sensibles al mismo, es un modelo válido que permite identificar las alteraciones epigenéticas y los cambios en expresión que acontecen como consecuencia del tratamiento con cisplatino en células tumorales de cáncer de ovario.
- 2) La confirmación en la base de datos pública TCGA, de la expresión alterada de un número representativo de genes candidatos identificados en nuestro modelo experimental bajo posible regulación epigenética, confirma el potencial valor traslacional de dicho modelo generado “*in vitro*” en nuestro laboratorio.
- 3) Los parámetros de análisis bioinformático centrados en el estudio de la secuenciación masiva del metiloma están en plena fase de desarrollo. La optimización del análisis binomial de la metilación (valores β) desarrollado en este estudio a través de metodologías complementarias, permite en primer lugar identificar los sesgos metodológicos asociados a la secuenciación del genoma completo modificado por bisulfito (WGBS); y en segundo lugar incrementar la correcta identificación de candidatos con verdadera metilación diferencial asociada al tratamiento con cisplatino.
- 4) La hipermetilación específica en líneas resistentes a cisplatino en regiones ubicadas en las orillas de las islas CpG (shore) y dentro del cuerpo del gen se asocian con el silenciamiento transcripcional de los genes *PAX9* y *FKBP1B* respectivamente, respaldando la hipótesis de que la metilación en regiones diferentes del promotor canónico pueden tener relevancia en la regulación de la transcripción. Este hallazgo contribuye a fomentar la búsqueda de nuevas regiones hipermetiladas con posible papel regulador transcripcional.
- 5) La sobreexpresión inducida del gen *FKBP1B* en la línea resistente OVCAR3-R incrementa la sensibilidad al tratamiento con cisplatino, evidenciado en el modelo experimental su potencial papel como biomarcador predictivo de respuesta a platino en cáncer de ovario.
- 6) El estudio traslacional realizado en 47 pacientes con cáncer de ovario y 1.200 pacientes procedentes de bases de datos de dominio público, muestran una relación estadísticamente significativa entre la presencia de metilación y la inhibición de la

CONCLUSIONES

expresión del gen *PAX9* sobre la supervivencia global y la progresión de la enfermedad respectivamente.

7) Según nuestras observaciones, los pacientes con fracaso terapéutico presentan metilación en la región identificada del gen *PAX9*, con la consecuente disminución en los datos de supervivencia global. Además existe una relación estadísticamente significativa entre los niveles bajos de expresión del gen *PAX9* y el descenso del tiempo libre la progresión. Estos datos evidencian la metilación en el área identificada del gen *PAX9* como posible región biomarcadora de uso clínico para la estratificación y estudio de la respuesta en pacientes con cáncer de ovario.

8) La simulación del funcionamiento “*in silico*” de una matriz predictiva de respuesta a tratamiento basado en platinos establecida a partir de diferentes combinaciones experimentales, permitió obtener resultados preliminares que seleccionan preferentemente los datos obtenidos por las técnicas de secuenciación masiva WGBS y RNA-seq así como la técnica de microarrays de expresión, ya que son estas las que permiten la identificación y traslación de una firma epigenética desde los modelos celulares a los datos obtenidos en muestras quirúrgicas de pacientes.

9) La validación de la presencia de metilación diferencial en una región reguladora de la expresión de transcritos específicos del gen *MEST* en muestras quirúrgicas demuestra en primer lugar, una simulación eficaz de nuestro modelo de matriz y en segundo lugar, evidencia la importancia del estudio de metilación específico asociado a cada uno de los transcritos candidatos a estar bajo regulación epigenética, lo que favorecería la identificación de nuevos marcadores capaces de predecir la evolución y posible respuesta terapéutica en cada paciente.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- AGARWAL, R. & KAYE, S. B. 2003. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 3, 502-16.
- AGATHANGGELOU, A., HONORIO, S., MACARTNEY, D. P., MARTINEZ, A., DALLOL, A., RADER, J., FULLWOOD, P., CHAUHAN, A., WALKER, R., SHAW, J. A., HOSOE, S., LERMAN, M. I., MINNA, J. D., MAHER, E. R. & LATIF, F. 2001. Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene*, 20, 1509-18.
- AKALIN, A., KORMAKSSON, M., LI, S., GARRETT-BAKELMAN, F. E., FIGUEROA, M. E., MELNICK, A. & MASON, C. E. 2012. methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome biology*, 13, R87.
- ARYEE, M. J., JAFFE, A. E., CORRADA-BRAVO, H., LADD-ACOSTA, C., FEINBERG, A. P., HANSEN, K. D. & IRIZARRY, R. A. 2014. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*, 30, 1363-1369.
- BALDWIN, R. L., NEMETH, E., TRAN, H., SHVARTSMAN, H., CASS, I., NAROD, S. & KARLAN, B. Y. 2000. BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer Res*, 60, 5329-33.
- BAST, R. C., JR., HENNESSY, B. & MILLS, G. B. 2009. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer*, 9, 415-28.
- BENJAMINI, Y. & SPEED, T. P. 2012. Summarizing and correcting the GC content bias in high-throughput sequencing. *Nucleic acids research*, gks001.
- BIBIKOVA, M., BARNES, B., TSAN, C., HO, V., KLOTZLE, B., LE, J. M., DELANO, D., ZHANG, L., SCHROTH, G. P. & GUNDERSON, K. L. 2011. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*, 98, 288-295.
- BIBIKOVA, M., LE, J., BARNES, B., SAEDINIA-MELNYK, S., ZHOU, L., SHEN, R. & GUNDERSON, K. L. 2009. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium® assay. *Epigenomics*, 1, 177-200.
- BLAKE, J. A. & ZIMAN, M. R. 2014. Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. *Development*, 141, 737-751.
- BRANCO, M. R., FICZ, G. & REIK, W. 2012. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat Rev Genet*, 13, 7-13.
- CACAN, E., ALI, M. W., BOYD, N. H., HOOKS, S. B. & GREER, S. F. 2014. Inhibition of HDAC1 and DNMT1 modulate RGS10 expression and decrease ovarian cancer chemoresistance. *PLoS One*, 9, e87455.
- CAMPOS, A. C., MOLOGNONI, F., MELO, F. H., GALDIERI, L. C., CARNEIRO, C. R., D'ALMEIDA, V., CORREA, M. & JASIULIONIS, M. G. 2007. Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. *Neoplasia*, 9, 1111-21.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N. 2011. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474, 609-15.
- CASNEUF, T., VAN DE PEER, Y. & HUBER, W. 2007. In situ analysis of cross-hybridisation on microarrays and the inference of expression correlation. *BMC Bioinformatics*, 8, 461.
- CIRILLO, P. M., WANG, E. T., CEDARS, M. I., CHEN, L. M. & COHN, B. A. 2016. Irregular menses predicts ovarian cancer: Prospective evidence from the Child Health and Development Studies. *Int J Cancer*, 139, 1009-17.
- CLARK-LANGONE, K. M., SANGLI, C., KRISHNAKUMAR, J. & WATSON, D. 2010. Translating tumor biology into personalized treatment planning: analytical performance characteristics of the Onco type DX® Colon Cancer Assay. *BMC cancer*, 10, 691.
- COLLINS, Y., DICIOCCIO, R., KEITZ, B., LELE, S. & ODUNSI, K. 2006. Methylation of death-associated protein kinase in ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Cancer*, 16 Suppl 1, 195-9.

BIBLIOGRAFÍA

- CRONIN, M., SANGLI, C., LIU, M.-L., PHO, M., DUTTA, D., NGUYEN, A., JEONG, J., WU, J., LANGONE, K. C. & WATSON, D. 2007. Analytical validation of the Oncotype DX genomic diagnostic test for recurrence prognosis and therapeutic response prediction in node-negative, estrogen receptor-“positive breast cancer. *Clinical chemistry*, 53, 1084-1091.
- CZEKIERDOWSKI, A., CZEKIERDOWSKA, S., SZYMANSKI, M., WIELGOS, M., KAMINSKI, P. & KOTARSKI, J. 2006. Opioid-binding protein/cell adhesion molecule-like (OPCML) gene and promoter methylation status in women with ovarian cancer. *Neuro Endocrinol Lett*, 27, 609-13.
- CHANG, X., MONITTO, C. L., DEMOKAN, S., KIM, M. S., CHANG, S. S., ZHONG, X., CALIFANO, J. A. & SIDRANSKY, D. Identification of hypermethylated genes associated with cisplatin resistance in human cancers. *Cancer Res*, 70, 2870-9.
- CHATTOPADHYAY, S., MACHADO-PINILLA, R., MANGUAN-GARCIA, C., BELDA-INIESTA, C., MORATILLA, C., CEJAS, P., FRESNO-VARA, J. A., DE CASTRO-CARPENÓ, J., CASADO, E., NISTAL, M., GONZALEZ-BARON, M. & PERONA, R. 2006. MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 25, 3335-45.
- CHEN, H. Y., LEE, Y. R. & CHEN, R. H. 2014. The functions and regulations of DAPK in cancer metastasis. *Apoptosis*, 19, 364-70.
- CHENG, P., SCHMUTTE, C., COFER, K. F., FELIX, J. C., YU, M. C. & DUBEAU, L. 1997. Alterations in DNA methylation are early, but not initial, events in ovarian tumorigenesis. *British journal of cancer*, 75, 396.
- CHMELAROVA, M., DVORAKOVA, E., SPACEK, J., LACO, J. & PALICKA, V. 2013. Importance of promoter methylation of GATA4 gene in epithelial ovarian cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 157, 294-7.
- CHO, K. R. & SHIH IE, M. 2009. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol*, 4, 287-313.
- DARST, R. P., PARDO, C. E., AI, L., BROWN, K. D. & KLABDE, M. P. 2010. Bisulfite sequencing of DNA. *Current Protocols in Molecular Biology*, 7.9. 1-7.9. 17.
- DAVIS, A., TINKER, A. V. & FRIEDLANDER, M. 2014. "Platinum resistant" ovarian cancer: what is it, who to treat and how to measure benefit? *Gynecol Oncol*, 133, 624-31.
- DE CACERES, I. I., CORTES-SEMPERE, M., MORATILLA, C., MACHADO-PINILLA, R., RODRIGUEZ-FANJUL, V., MANGUAN-GARCIA, C., CEJAS, P., LÓPEZ-RÍOS, F., PAZ-ARES, L. & DE CASTROCARPEÑO, J. 2010. IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 29, 1681-1690.
- DEPLUS, R., BRENNER, C., BURGERS, W. A., PUTMANS, P., KOUZARIDES, T., DE LAUNOIT, Y. & FUKS, F. 2002. Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res*, 30, 3831-8.
- DOLZHENKO, E. & SMITH, A. D. 2014. Using beta-binomial regression for high-precision differential methylation analysis in multifactor whole-genome bisulfite sequencing experiments. *BMC bioinformatics*, 15, 215.
- DU BOIS, A., LUCK, H. J., MEIER, W., ADAMS, H. P., MOBUS, V., COSTA, S., BAUKNECHT, T., RICHTER, B., WARM, M., SCHRODER, W., OLBRIGHT, S., NITZ, U., JACKISCH, C., EMONS, G., WAGNER, U., KUHN, W. & PFISTERER, J. 2003. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*, 95, 1320-9.
- EADS, C. A., DANENBERG, K. D., KAWAKAMI, K., SALTZ, L. B., BLAKE, C., SHIBATA, D., DANENBERG, P. V. & LAIRD, P. W. 2000. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res*, 28, E32.
- EHRlich, M. 2005. DNA methylation and cancer-associated genetic instability. *Adv Exp Med Biol*, 570, 363-92.
- EHRlich, M. 2009. DNA hypomethylation in cancer cells.

BIBLIOGRAFÍA

- EHRlich, M., WOODS, C. B., YU, M. C., DUBEAU, L., YANG, F., CAMPAN, M., WEISENBERGER, D. J., LONG, T. I., YOUN, B. & FIALA, E. S. 2006. Quantitative analysis of associations between DNA hypermethylation, hypomethylation, and DNMT RNA levels in ovarian tumors. *Oncogene*, 25, 2636-2645.
- ESTELLER, M., SILVA, J. M., DOMINGUEZ, G., BONILLA, F., MATIAS-GUIU, X., LERMA, E., BUSSAGLIA, E., PRAT, J., HARKES, I. C., REPASKY, E. A., GABRIELSON, E., SCHUTTE, M., BAYLIN, S. B. & HERMAN, J. G. 2000. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst*, 92, 564-9.
- FLICEK, P., AHMED, I., AMODE, M. R., BARRELL, D., BEAL, K., BRENT, S., CARVALHO-SILVA, D., CLAPHAM, P., COATES, G. & FAIRLEY, S. 2012. Ensembl 2013. *Nucleic acids research*, gks1236.
- FORTIN, J.-P., LABBE, A., LEMIRE, M., ZANKE, B. W., HUDSON, T. J., FERTIG, E. J., GREENWOOD, C. M. & HANSEN, K. D. 2014. Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome biology*, 15, 503.
- GALLUZZI, L., SENOVILLA, L., VITALE, I., MICHELS, J., MARTINS, I., KEPP, O., CASTEDO, M. & KROEMER, G. 2012. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31, 1869-83.
- GERBER, J. K., RICHTER, T., KREMMER, E., ADAMSKI, J., HÄFFLER, H., BALLING, R. & PETERS, H. 2002. Progressive loss of PAX9 expression correlates with increasing malignancy of dysplastic and cancerous epithelium of the human oesophagus. *J Pathol*, 197, 293-297.
- GIFFORD, G., PAUL, J., VASEY, P. A., KAYE, S. B. & BROWN, R. 2004. The acquisition of hMLH1 methylation in plasma DNA after chemotherapy predicts poor survival for ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*, 10, 4420-6.
- GLYNN, T., SEFFRIN, J. R., BRAWLEY, O. W., GREY, N. & ROSS, H. 2010. The globalization of tobacco use: 21 challenges for the 21st century. *CA Cancer J Clin*, 60, 50-61.
- HAH, S. S., STIVERS, K. M., DE VERE WHITE, R. W. & HENDERSON, P. T. 2006. Kinetics of carboplatin-DNA binding in genomic DNA and bladder cancer cells as determined by accelerator mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*, 19, 622-6.
- HAMILTON, T. C. 1992. Ovarian cancer, Part I: Biology. *Curr Probl Cancer*, 16, 1-57.
- HARRAR, Y. L., BELLINI, C. & FAURE, J.-D. 2001. FKBP: at the crossroads of folding and transduction. *Trends in plant science*, 6, 426-431.
- HE, X., YANG, J., ZHANG, Q., CUI, H. & ZHANG, Y. 2013. Shortening of the 3'untranslated region: an important mechanism leading to overexpression of HMGA2 in serous ovarian cancer. *Chinese medical journal*, 127, 494-499.
- HEGI, M. E., DISERENS, A. C., GORLIA, T., HAMOU, M. F., DE TRIBOLET, N., WELLER, M., KROS, J. M., HAINFELLNER, J. A., MASON, W., MARIANI, L., BROMBERG, J. E., HAU, P., MIRIMANOFF, R. O., CAIRNCROSS, J. G., JANZER, R. C. & STUPP, R. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, 352, 997-1003.
- HERMAN, J. G. & BAYLIN, S. B. 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New England Journal of Medicine*, 349, 2042-2054.
- HERMAN, J. G., GRAFF, J. R., MYOHANEN, S., NELKIN, B. D. & BAYLIN, S. B. 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9821-6.
- HOLLIDAY, R. & PUGH, J. E. 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187, 226-32.
- HORIKE, S., CAI, S., MIYANO, M., CHENG, J. F. & KOHWI-SHIGEMATSU, T. 2005. Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat Genet*, 37, 31-40.

BIBLIOGRAFÍA

- HUBER, W., VON HEYDEBRECK, A., SULTMANN, H., POUSTKA, A. & VINGRON, M. 2002. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics*, 18 Suppl 1, S96-104.
- IBANEZ DE CACERES, I., BATTAGLI, C., ESTELLER, M., HERMAN, J. G., DULAIMI, E., EDELSON, M. I., BERGMAN, C., EHYA, H., EISENBERG, B. L. & CAIRNS, P. 2004. Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *Cancer Res*, 64, 6476-81.
- JACINTO, E. & HALL, M. N. 2003. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4, 117-126.
- JI, L., SASAKI, T., SUN, X., MA, P., LEWIS, Z. A. & SCHMITZ, R. J. 2014. Methylated DNA is over-represented in whole-genome bisulfite sequencing data. *Frontiers in genetics*, 5, 341.
- JONES, P. A. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13, 484-492.
- JONES, P. A. & BAYLIN, S. B. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews genetics*, 3, 415-428.
- KARST, A. M. & DRAPKIN, R. 2009. Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution. *Journal of oncology*, 2010.
- KARTHA, G. K., NYAME, Y. & KLEIN, E. A. 2014. Evaluation of the Oncotype DX genomic prostate score for risk stratification in prostate cancer patients considered candidates for active surveillance. American Society of Clinical Oncology.
- KNUDSON, A. G., JR. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68, 820-3.
- KOHDA, M., HOSHIYA, H., KATOH, M., TANAKA, I., MASUDA, R., TAKEMURA, T., FUJIWARA, M. & OSHIMURA, M. 2001. Frequent loss of imprinting of IGF2 and MEST in lung adenocarcinoma. *Molecular carcinogenesis*, 31, 184-191.
- KURMAN, R. J. & SHIH IE, M. 2010. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*, 34, 433-43.
- KURMAN, R. J. & SHIH IE, M. 2011. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol*, 42, 918-31.
- LAM, E., MARTIN, M. M., TIMERMAN, A. P., SABERS, C., FLEISCHER, S., LUKAS, T., ABRAHAM, R. T., O'KEEFE, S. J., O'NEILL, E. A. & WIEDERRECHT, G. J. 1995. A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 26511-26522.
- LAUBACH, J. P., MOREAU, P., SAN-MIGUEL, J. F. & RICHARDSON, P. G. 2015. Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*, 21, 4767-73.
- LI, B. & DEWEY, C. N. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*, 12, 323.
- LI, S., HANSMAN, R., NEWBOLD, R., DAVIS, B., MCLACHLAN, J. A. & BARRETT, J. C. 2003. Neonatal diethylstilbestrol exposure induces persistent elevation of c-fos expression and hypomethylation in its exon 4 in mouse uterus. *Molecular carcinogenesis*, 38, 78-84.
- LISTER, R., PELIZZOLA, M., DOWEN, R. H., HAWKINS, R. D., HON, G., TONTI-FILIPPINI, J., NERY, J. R., LEE, L., YE, Z., NGO, Q. M., EDSALL, L., ANTOSIEWICZ-BOURGET, J., STEWART, R., RUOTTI, V., MILLAR, A. H., THOMSON, J. A., REN, B. & ECKER, J. R. 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462, 315-22.
- LIU, T., XIONG, J., YI, S., ZHANG, H., ZHOU, S., GU, L. & ZHOU, M. 2016. FKBP12 enhances sensitivity to chemotherapy-induced cancer cell apoptosis by inhibiting MDM2. *Oncogene*.
- LOKICH, J. & ANDERSON, N. 1998. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. *Ann Oncol*, 9, 13-21.

BIBLIOGRAFÍA

- LOVE, M. I., ANDERS, S., KIM, V. & HUBER, W. 2016. RNA-Seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression. *F1000Research*, 4.
- LUQMANI, Y. A. 2005. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract*, 14 Suppl 1, 35-48.
- LLOYD, K. L., CREE, I. A. & SAVAGE, R. S. 2015. Prediction of resistance to chemotherapy in ovarian cancer: a systematic review. *BMC cancer*, 15, 117.
- MAKARLA, P. B., SABOORIAN, M. H., ASHFAQ, R., TOYOOKA, K. O., TOYOOKA, S., MINNA, J. D., GAZDAR, A. F. & SCHORGE, J. O. 2005. Promoter hypermethylation profile of ovarian epithelial neoplasms. *Clin Cancer Res*, 11, 5365-9.
- MARTIN, M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17, pp. 10-12.
- MARULLO, R., WERNER, E., DEGTYAREVA, N., MOORE, B., ALTAVILLA, G., RAMALINGAM, S. S. & DOETSCH, P. W. 2013. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One*, 8, e81162.
- MATEI, D., FANG, F., SHEN, C., SCHILDER, J., ARNOLD, A., ZENG, Y., BERRY, W. A., HUANG, T. & NEPHEW, K. P. 2012. Epigenetic resensitization to platinum in ovarian cancer. *Cancer Res*, 72, 2197-205.
- MAUNAKEA, A. K., NAGARAJAN, R. P., BILENKY, M., BALLINGER, T. J., D'SOUZA, C., FOUSE, S. D., JOHNSON, B. E., HONG, C., NIELSEN, C. & ZHAO, Y. 2010. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature*, 466, 253-257.
- MCCARTHY, D. J., CHEN, Y. & SMYTH, G. K. 2012. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic acids research*, gks042.
- MCGOOKIN, R. 1984. RNA Extraction by the Guanidine Thiocyanate Procedure. In: WALKER, J. M. (ed.) *Nucleic Acids*. Totowa, NJ: Humana Press.
- MOLARO, A., HODGES, E., FANG, F., SONG, Q., MCCOMBIE, W. R., HANNON, G. J. & SMITH, A. D. 2011. Sperm methylation profiles reveal features of epigenetic inheritance and evolution in primates. *Cell*, 146, 1029-1041.
- MOORE, L. D., LE, T. & FAN, G. 2013. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38, 23-38.
- MORRIS, T. J., BUTCHER, L. M., FEBER, A., TESCHENDORFF, A. E., CHAKRAVARTHY, A. R., WOJDACZ, T. K. & BECK, S. 2014. ChAMP: 450k chip analysis methylation pipeline. *Bioinformatics*, 30, 428-430.
- NGUYEN, H. T., TIAN, G. & MURPH, M. M. 2014. Molecular epigenetics in the management of ovarian cancer: are we investigating a rational clinical promise? *Front Oncol*, 4, 71.
- NIU, Y., DESMARAIS, T. L., TONG, Z., YAO, Y. & COSTA, M. 2015. Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation. *Free Radic Biol Med*, 82, 22-8.
- ORTMANN, C. A., EISELE, L., NÄCKEL, H., KLEIN-HITPASS, L., FÄHRER, A., DÄHRSEN, U. & ZESCHNIGK, M. 2008. Aberrant hypomethylation of the cancer testis antigen PRAME correlates with PRAME expression in acute myeloid leukemia. *Annals of hematology*, 87, 809.
- OZDEMIR, F., ALTINISIK, J., KARATEKE, A., COKSÜER, H. & BUYRU, N. 2012. Methylation of tumor suppressor genes in ovarian cancer. *Exp Ther Med*, 4, 1092-1096.
- PEDERSEN, I. S., DERVAN, P., MCGOLDRICK, A., HARRISON, M., PONCHEL, F., SPEIRS, V., ISAACS, J. D., GOREY, T. & MCCANN, A. 2002. Promoter switch: a novel mechanism causing biallelic PEG1/MEST expression in invasive breast cancer. *Human molecular genetics*, 11, 1449-1453.
- PEDERSEN, I. S., DERVAN, P. A., BRODERICK, D., HARRISON, M., MILLER, N., DELANY, E., O'SHEA, D., COSTELLO, P., MCGOLDRICK, A. & KEATING, G. 1999. Frequent loss of imprinting of PEG1/MEST in invasive breast cancer. *Cancer research*, 59, 5449-5451.

BIBLIOGRAFÍA

- PEI, H., LI, L., FRIDLEY, B. L., JENKINS, G. D., KALARI, K. R., LINGLE, W., PETERSEN, G., LOU, Z. & WANG, L. 2009. FKBP51 affects cancer cell response to chemotherapy by negatively regulating Akt. *Cancer cell*, 16, 259-266.
- PFISTERER, J. & LEDERMANN, J. A. 2006. Management of platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Semin Oncol*, 33, S12-6.
- PILETIC, K. & KUNEJ, T. 2016. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch Toxicol*, 90, 2405-19.
- PLUMB, J. A., STRATHDEE, G., SLUDDEN, J., KAYE, S. B. & BROWN, R. 2000. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res*, 60, 6039-44.
- PONGER, L. & MOUCHIROUD, D. 2002. CpGProD: identifying CpG islands associated with transcription start sites in large genomic mammalian sequences. *Bioinformatics*, 18, 631-3.
- REIK, W. & WALTER, J. 2001. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet*, 2, 21-32.
- RIGGS, A. D. 1975. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet*, 14, 9-25.
- ROBERTSON, K. D. 2005. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*, 6, 597-610.
- ROBINSON, M. D. & OSHLACK, A. 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome biology*, 11, R25.
- ROBSON, E. J. D., HE, S.-J. & ECCLES, M. R. 2006. A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nature Reviews Cancer*, 6, 52-62.
- ROSEN, D. G., YANG, G., LIU, G., MERCADO-URIBE, I., CHANG, B., XIAO, X. S., ZHENG, J., XUE, F. X. & LIU, J. 2009. Ovarian cancer: pathology, biology, and disease models. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 2089-102.
- SAAD, A. S., GHALI, R. R. & SHAWKI, M. A. 2017. A prospective randomized controlled study of cisplatin versus carboplatin-based regimen in advanced squamous nonsmall cell lung cancer.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- SELLAR, G. C., WATT, K. P., RABIASZ, G. J., STRONACH, E. A., LI, L., MILLER, E. P., MASSIE, C. E., MILLER, J., CONTRERAS-MOREIRA, B., SCOTT, D., BROWN, I., WILLIAMS, A. R., BATES, P. A., SMYTH, J. F. & GABRA, H. 2003. OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer. *Nat Genet*, 34, 337-43.
- SHARMA, S. V., LEE, D. Y., LI, B., QUINLAN, M. P., TAKAHASHI, F., MAHESWARAN, S., MCDERMOTT, U., AZIZIAN, N., ZOU, L., FISCHBACH, M. A., WONG, K. K., BRANDSTETTER, K., WITTNER, B., RAMASWAMY, S., CLASSON, M. & SETTLEMAN, J. 2010. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*, 141, 69-80.
- SLODKOWSKA, E. A. & ROSS, J. S. 2009. MammaPrint®, a 70-gene signature: another milestone in personalized medical care for breast cancer patients. *Expert review of molecular diagnostics*, 9, 417-422.
- SMYTH, G. K. 2005. Limma: linear models for microarray data. *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*. Springer.
- SOTO, J., RODRIGUEZ-ANTOLIN, C., VALLESPIN, E., DE CASTRO CARPENO, J. & IBANEZ DE CACERES, I. 2016. The impact of next-generation sequencing on the DNA methylation-based translational cancer research. *Transl Res*, 169, 1-18 e1.
- STAPLETON, P., WEITH, A., URBÄNEK, P., KOZMIK, Z. & BUSSLINGER, M. 1993. Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX-9. *Nature genetics*, 3, 292-298.

BIBLIOGRAFÍA

- STAUB, J., CHIEN, J., PAN, Y., QIAN, X., NARITA, K., ALETTI, G., SCHEERER, M., ROBERTS, L. R., MOLINA, J. & SHRIDHAR, V. 2007. Epigenetic silencing of HSulf-1 in ovarian cancer: implications in chemoresistance. *Oncogene*, 26, 4969-78.
- STIRZAKER, C., TABERLAY, P. C., STATHAM, A. L. & CLARK, S. J. 2014. Mining cancer methylomes: prospects and challenges. *Trends Genet*, 30, 75-84.
- STORDAL, B., TIMMS, K., FARRELLY, A., GALLAGHER, D., BUSSCHOTS, S., RENAUD, M., THERY, J., WILLIAMS, D., POTTER, J., TRAN, T., Korpanty, G., CREMONA, M., CAREY, M., LI, J., LI, Y., ASLAN, O., O'LEARY, J. J., MILLS, G. B. & HENNESSY, B. T. 2013. BRCA1/2 mutation analysis in 41 ovarian cell lines reveals only one functionally deleterious BRCA1 mutation. *Mol Oncol*, 7, 567-79.
- STRATHDEE, G., APPLETON, K., ILLAND, M., MILLAN, D. W., SARGENT, J., PAUL, J. & BROWN, R. 2001. Primary ovarian carcinomas display multiple methylator phenotypes involving known tumor suppressor genes. *Am J Pathol*, 158, 1121-7.
- SZÁSZ, A. M., LÁNCZKY, A., NAGY, Á., FÖRSTER, S., HARK, K., SZABÓ, A. & GYÖRFFY, B. 2016. Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1,065 patients. *Oncotarget*, 49322-49333.
- TAKAI, D. & JONES, P. A. 2002. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3740-5.
- TAKAI, D. & JONES, P. A. 2003. The CpG island searcher: a new WWW resource. *In Silico Biol*, 3, 235-40.
- TAM, K. F., LIU, V. W., LIU, S. S., TSANG, P. C., CHEUNG, A. N., YIP, A. M. & NGAN, H. Y. 2007. Methylation profile in benign, borderline and malignant ovarian tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*, 133, 331-41.
- TANIGUCHI, T., TISCHKOWITZ, M., AMEZIANE, N., HODGSON, S. V., MATHEW, C. G., JOENJE, H., MOK, S. C. & D'ANDREA, A. D. 2003. Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nat Med*, 9, 568-74.
- TEODORIDIS, J. M., HALL, J., MARSH, S., KANNALL, H. D., SMYTH, C., CURTO, J., SIDDIQUI, N., GABRA, H., MCLEOD, H. L., STRATHDEE, G. & BROWN, R. 2005. CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer. *Cancer Res*, 65, 8961-7.
- TOSS, A., DE MATTEIS, E., ROSSI, E., CASA, L. D., IANNONE, A., FEDERICO, M. & CORTESI, L. 2013. Ovarian cancer: can proteomics give new insights for therapy and diagnosis? *Int J Mol Sci*, 14, 8271-90.
- TOUGERON, D., LECOMTE, T., PAGÈS, J.-C., VILLALVA, C., COLLIN, C., FERRU, A., TOURANI, J. M., SILVAIN, C., LEVILLAIN, P. & KARAYAN-TAPON, L. 2013. Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Annals of oncology*, 24, 1267-1273.
- URSULA A. MATULONIS, A. M. O., ANGELES ALVAREZ SECORD, LYNDIA D. ROMAN, SARAH PATRICIA BLAGDEN, SUSANA N. BANERJEE, J C ELKAS, JOHN J. NEMUNAITIS, SHARAD A. GHAMANDE, GINI F. FLEMING, MERRY JENNIFER MARKHAM, HAL W. HIRTE, DIANE M. PROVENCHER, BRISTI BASU, REBECCA SOPHIE KRISTELEIT, SUE NAIM, YONG HAO, HAROLD N. KEER, MOHAMMAD AZAB, DANIELA MATEI. 2016. Epigenetic resensitization to platinum in recurrent, platinum-resistant ovarian cancer (OC) using guadecitabine (SGI-110), a novel hypomethylating agent (HMA): Results of a randomized phase II study. Indianapolis: Indiana University Simon Cancer Center.
- VEECK, J., ROPERO, S., SETIEN, F., GONZALEZ-SUAREZ, E., OSORIO, A., BENITEZ, J., HERMAN, J. G. & ESTELLER, M. 2010. BRCA1 CpG island hypermethylation predicts sensitivity to poly(adenosine diphosphate)-ribose polymerase inhibitors. *J Clin Oncol*, 28, e563-4; author reply e565-6.
- VIDAL, A. C., HENRY, N., MURPHY, S., ONEKO, O., NYE, M., BARTLETT, J., OVERCASH, F., HUANG, Z., WANG, F. & MLAY, P. 2014. PEG1/MEST and IGF2 DNA methylation in CIN and in cervical cancer. *Clinical and Translational Oncology*, 16, 266-272.

BIBLIOGRAFÍA

- VU, T. H. & HOFFMAN, A. R. 1994. Promoter-specific imprinting of the human insulin-like growth factor-II gene. *Nature*, 371, 714.
- WANG, Z., LI, M., LU, S., ZHANG, Y. & WANG, H. 2006. Promoter hypermethylation of FANCF plays an important role in the occurrence of ovarian cancer through disrupting Fanconi anemia-BRCA pathway. *Cancer Biol Ther*, 5, 256-60.
- WATANABE, Y., UEDA, H., ETOH, T., KOIKE, E., FUJINAMI, N., MITSUHASHI, A. & HOSHIAI, H. 2007. A change in promoter methylation of hMLH1 is a cause of acquired resistance to platinum-based chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res*, 27, 1449-52.
- WEISENBERGER, D. J., VAN DEN BERG, D., PAN, F., BERMAN, B. P. & LAIRD, P. W. 2008. Comprehensive DNA methylation analysis on the Illumina Infinium assay platform. *Illumina, San Diego*.
- WILEY, A., KATSAROS, D., CHEN, H., RIGAUULT DE LA LONGRAIS, I. A., BEEGHLY, A., PUOPOLO, M., SINGAL, R., ZHANG, Y., AMOAKO, A., ZELTERMAN, D. & YU, H. 2006a. Aberrant promoter methylation of multiple genes in malignant ovarian tumors and in ovarian tumors with low malignant potential. *Cancer*, 107, 299-308.
- WILEY, A., KATSAROS, D., FRACCHIOLI, S. & YU, H. 2006b. Methylation of the insulin-like growth factor binding protein-3 gene and prognosis of epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 16, 210-8.
- WOOD, R. D., ARAUJO, S. J., ARIZA, R. R., BATTY, D. P., BIGGERSTAFF, M., EVANS, E., GAILLARD, P. H., GUNZ, D., KOBERLE, B., KURAOKA, I., MOGGS, J. G., SANDALL, J. K. & SHIVJI, M. K. 2000. DNA damage recognition and nucleotide excision repair in mammalian cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 65, 173-82.
- WRIGHT, A. A., BOHLKE, K., ARMSTRONG, D. K., BOOKMAN, M. A., CLIBY, W. A., COLEMAN, R. L., DIZON, D. S., KASH, J. J., MEYER, L. A. & MOORE, K. N. 2016. Neoadjuvant chemotherapy for newly diagnosed, advanced ovarian cancer: Society of Gynecologic Oncology and American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *Journal of Clinical Oncology*, 34, 3460-3473.
- WU, Q., LOTHE, R. A., AHLQUIST, T., SILINS, I., TROPE, C. G., MICCI, F., NESLAND, J. M., SUO, Z. & LIND, G. E. 2007. DNA methylation profiling of ovarian carcinomas and their in vitro models identifies HOXA9, HOXB5, SCGB3A1, and CRABP1 as novel targets. *Mol Cancer*, 6, 45.
- XING, B. L., LI, T., TANG, Z. H., JIAO, L., GE, S. M., QIANG, X. & OUYANG, J. 2015. Cumulative methylation alternations of gene promoters and protein markers for diagnosis of epithelial ovarian cancer. *Genet Mol Res*, 14, 4532-40.
- YANG, H. J., LIU, V. W., WANG, Y., TSANG, P. C. & NGAN, H. Y. 2006. Differential DNA methylation profiles in gynecological cancers and correlation with clinico-pathological data. *BMC Cancer*, 6, 212.
- YANG, X., HAN, H., DE CARVALHO, D. D., LAY, F. D., JONES, P. A. & LIANG, G. 2014. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer cell*, 26, 577-590.
- ZAMPIERI, M., CICCARONE, F., CALABRESE, R., FRANCESCHI, C., BURKLE, A. & CAIAFA, P. 2015. Reconfiguration of DNA methylation in aging. *Mech Ageing Dev*, 151, 60-70.
- ZELLER, C., DAI, W., STEELE, N. L., SIDDIQ, A., WALLEY, A. J., WILHELM-BENARTZI, C. S., RIZZO, S., VAN DER ZEE, A., PLUMB, J. A. & BROWN, R. 2012. Candidate DNA methylation drivers of acquired cisplatin resistance in ovarian cancer identified by methylome and expression profiling. *Oncogene*, 31, 4567-76.
- ZHANG, X., WU, M., XIAO, H., LEE, M. T., LEVIN, L., LEUNG, Y. K. & HO, S. M. 2010. Methylation of a single intronic CpG mediates expression silencing of the PMP24 gene in prostate cancer. *The Prostate*, 70, 765-776.

BIBLIOGRAFÍA

- ZHOU, F., TAO, G., CHEN, X., XIE, W., LIU, M. & CAO, X. 2014. Methylation of OPCML promoter in ovarian cancer tissues predicts poor patient survival. *Clin Chem Lab Med*, 52, 735-42.
- ZILLER, M. J., HANSEN, K. D., MEISSNER, A. & ARYEE, M. J. 2015. Coverage recommendations for methylation analysis by whole-genome bisulfite sequencing. *Nature methods*, 12, 230-232.
- ZUBERI, M., MIR, R., DHOLARIYA, S., NAJAR, I., YADAV, P., JAVID, J., GURU, S., MIRZA, M., GANDHI, G. & KHURANA, N. 2014. RASSF1 and PTEN promoter hypermethylation influences the outcome in epithelial ovarian cancer. *Clinical Ovarian and Other Gynecologic Cancer*, 7, 33-39.

ANEXO 1

ANEXO 1

GEN	METILACIÓN RvsS	UBICACIÓN	LÍNEA CELULAR	COORDENADAS REGIÓN VISTA EN WGBS	POSICIONES DIFERENCIALMENTE METILADAS EN WGBS
<i>FABP5</i>	1	ALFA	A2780	Chr8 – 82192470 – 82192983	31
<i>METRNL</i>	1	ALFA	A2780	Chr17 – 81050913 – 81050986	7
<i>NET1</i>	1	ALFA	A2780	Chr10 – 5488367 – 5488565	7
<i>ZFP90</i>	1	ALFA	OVCAR3	Chr16 – 68563766 – 68563842	6
<i>S100A10</i>	1	ALFA	A2780	Chr1 – 151965435 – 151965708	5
<i>PAX9</i>	1	ALFA	OVCAR3	Chr14 – 37126724 – 37126752	3
<i>GPC4</i>	2	ALFA	A2780	ChrX – 132548818 – 132548982	11
<i>ANKRD9</i>	2	ALFA	A2780	Chr14 – 102976690 – 102976918	7
<i>ANKRD9</i>	2	ALFA	OVCAR3	Chr14 – 102975487 – 102975577	6
<i>CAMKK2</i>	4	ALFA	OVCAR3	Chr12 – 121734955 – 121735103	15
<i>MAP3K5</i>	4	ALFA	OVCAR3	Chr6 – 137114292 – 137114388	11
<i>LEMD2</i>	4	ALFA	A2780	Chr6 – 33756933 – 33756983	9
<i>CAMKK2</i>	4	ALFA	A2780	Chr12 – 121735503 – 121735731	7

Tabla 1. Genes candidatos cuyas regiones genómicas diferencialmente metiladas están cercanas al sitio del inicio de la transcripción.

GEN	METILACIÓN RvsS	UBICACIÓN	LÍNEA CELULAR	COORDENADAS REGIÓN VISTA EN WGBS	POSICIONES DIFERENCIALMENTE METILADAS EN WGBS
<i>CFD</i>	1	BETA	OVCAR3	Chr19 – 855742 – 855840	11
<i>CFD</i>	1	BETA	OVCAR3	Chr19 – 856657 – 856766	5
<i>CFD</i>	1	BETA	A2780	Chr19 – 856652 – 856682	4
<i>CFD</i>	1	BETA	OVCAR3	Chr19 – 857418 – 857459	4
<i>CFD</i>	1	BETA	OVCAR3	Chr19 – 857764 – 857774	2
<i>PAX9</i>	1	BETA	OVCAR3	Chr14 – 37126843 – 37127362	27
<i>CFD</i>	2	BETA	A2780	Chr19 – 855627 – 855861	20
<i>ACTG1</i>	2	BETA	OVCAR3	Chr17 – 794859652 – 79486207	19
<i>HMGB3</i>	2	BETA	A2780	ChrX – 150152239 – 150152324	13
<i>METRNL</i>	2	BETA	A2780	Chr17 – 81040415 – 81040703	6
<i>ACTG1</i>	2	BETA	A2780	Chr17 – 79485795 – 79485848	3
<i>METRNL</i>	3	BETA	A2780	Chr17 – 81045767 – 81046027	9
<i>ACTG1</i>	3	BETA	OVCAR3	Chr17 – 79495396 – 79495496	6
<i>LEMD2</i>	4	BETA	A2780	Chr6 – 33756310 – 33756400	15
<i>METRNL</i>	4	BETA	A2780	Chr17 – 81036569 – 81036653	10
<i>METRNL</i>	4	BETA	A2780	Chr17 – 81047241 – 81047291	3

Tabla 2. Genes candidatos cuyas regiones genómicas diferencialmente metiladas se localizan en dirección 5' a más de 2 kb y a 4kb del inicio de las regiones “shores” y “shelves”.

ANEXO 1

GEN	METILACIÓN RvsS	UBICACIÓN	LÍNEA CELULAR	COORDENADAS REGIÓN VISTA EN WGBS	POSICIONES DIFERENCIALMENTE METILADAS EN WGBS
<i>FKBP1B</i>	1	GAMMA	OVCAR3	Chr2 – 24272974 – 24273192	17
<i>CACNA1I</i>	1	GAMMA	A2780	Chr22 – 40057924 – 40058111	13
<i>S100A10</i>	1	GAMMA	A2780	Chr1 – 151966634 – 151966809	11
<i>ZFP90</i>	1	GAMMA	A2780	Chr16 – 68564001 – 68564136	11
<i>CFD</i>	1	GAMMA	OVCAR3	Chr19 – 863131 – 863245	9
<i>ABCA4</i>	1	GAMMA	OVCAR3	Chr1 – 94561066 – 94561144	5
<i>VAV3</i>	1	GAMMA	A2780	Chr1 – 108506567 – 108506644	4
<i>RTN4R</i>	1	GAMMA	OVCAR3	Chr22 – 20254896 – 20254912	3
<i>NCKIPSD</i>	2	GAMMA	OVCAR3	Chr3 – 48698379 – 48698635	18
<i>CACNA1I</i>	2	GAMMA	A2780	Chr22 – 40060779 – 40060987	11
<i>CFD</i>	2	GAMMA	A2780	Chr19 – 861823 – 861929	9
<i>PAX9</i>	2	GAMMA	OVCAR3	Chr14 – 37132541 – 37132785	9
<i>VAV3</i>	2	GAMMA	A2780	Chr1 – 108507341 – 108507428	7
<i>HOXB6</i>	2	GAMMA	A2780	Chr17 – 46671931 – 46672164	6
<i>SHF</i>	2	GAMMA	OVCAR3	Chr15 – 45479638 – 45479698	6
<i>GLDC</i>	2	GAMMA	A2780	Chr9 – 6644604 – 6644758	5
<i>CACNA1I</i>	2	GAMMA	OVCAR3	Chr22 – 40060864 – 40060910	4
<i>KIF3C</i>	2	GAMMA	OVCAR3	Chr2 – 26204635 – 26204741	4
<i>RCAN3</i>	2	GAMMA	A2780	Chr1 – 24861709 – 24861731	4
<i>IFI16</i>	2	GAMMA	OVCAR3	Chr1 – 158991847 – 158991899	3
<i>NCKIPSD</i>	3	GAMMA	OVCAR3	Chr3 – 48699517 – 48699707	6
<i>RILP</i>	3	GAMMA	A2780	Chr17 – 1551788 – 1552084	6
<i>ATP12A</i>	3	GAMMA	A2780	Chr13 – 25260770 – 25260875	4
<i>CACNA1I</i>	3	GAMMA	A2780	Chr22 – 40058747 – 40058765	4
<i>CTGF</i>	3	GAMMA	A2780	Chr6 – 132271184 – 132271336	3
<i>NCKIPSD</i>	4	GAMMA	A2780	Chr3 – 48699482 – 48699773	17
<i>CAMKK2</i>	4	GAMMA	OVCAR3	Chr12 – 121734418 – 121734517	16
<i>NCKIPSD</i>	4	GAMMA	A2780	Chr3 – 48701190 – 48701437	15
<i>ACTG1</i>	4	GAMMA	A2780	Chr17 – 79478587 – 79478840	7
<i>HOXB6</i>	4	GAMMA	A2780	Chr17 – 46673977 – 46674015	4
<i>HOXB6</i>	4	GAMMA	A2780	Chr17 – 46673543 – 46673605	3

Tabla 3. Genes candidatos cuyas regiones genómicas diferencialmente metiladas se localizan dentro del cuerpo del gen.

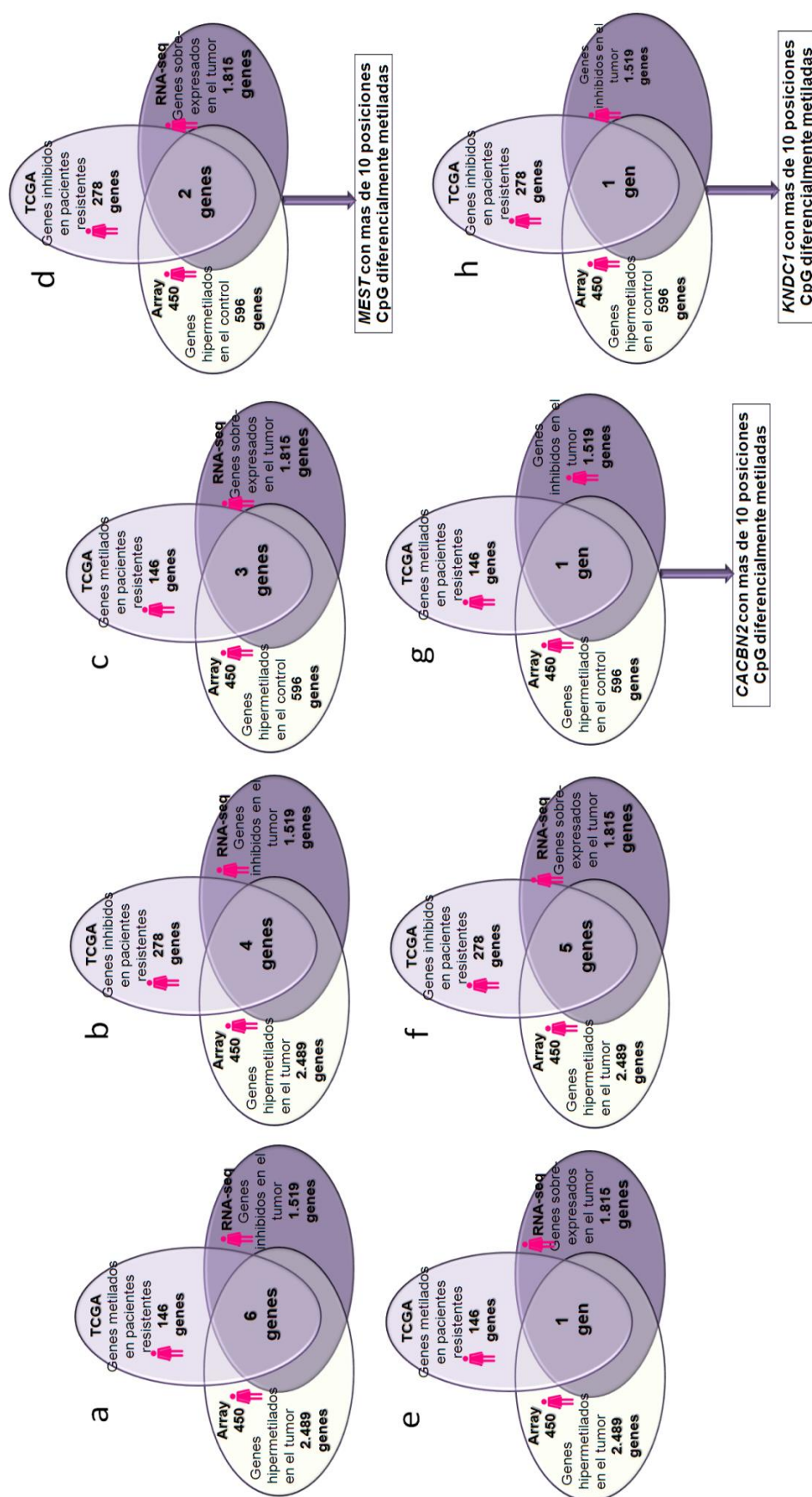
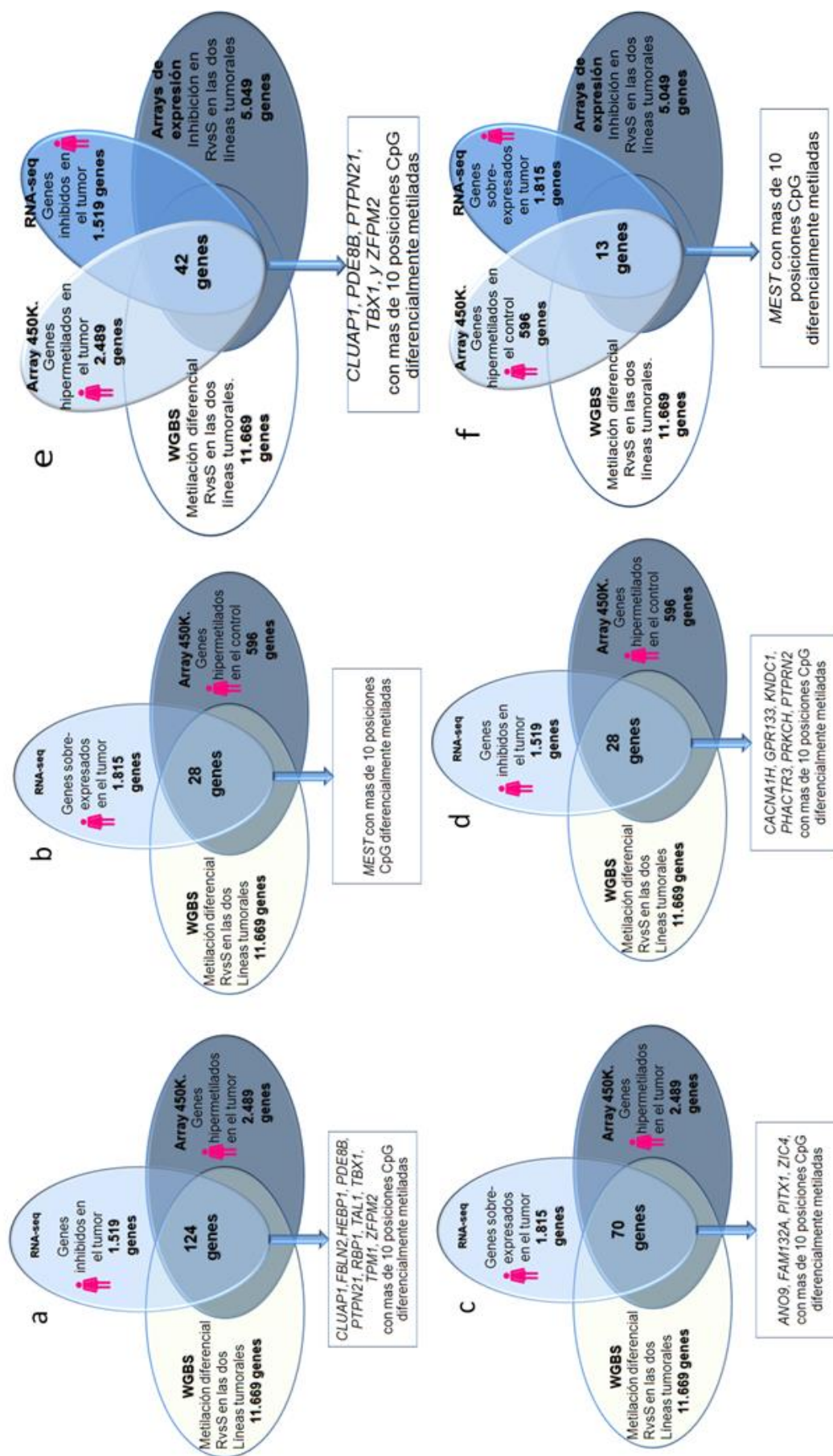


Figura 1. Contrastes del grupo 2. Los diagramas a, b, c, d, e, f, g y h muestran los resultados de los análisis desarrollados entre los arrayS de metilación 450K teniendo en cuenta los genes hipermetilados en los tumores y en el control y los datos de transcriptoma obtenidos por RNA-seq considerando los genes inhibidos y sobre-expresados en el tumor asociados con los datos de metilación y expresión de los pacientes del TCGA.



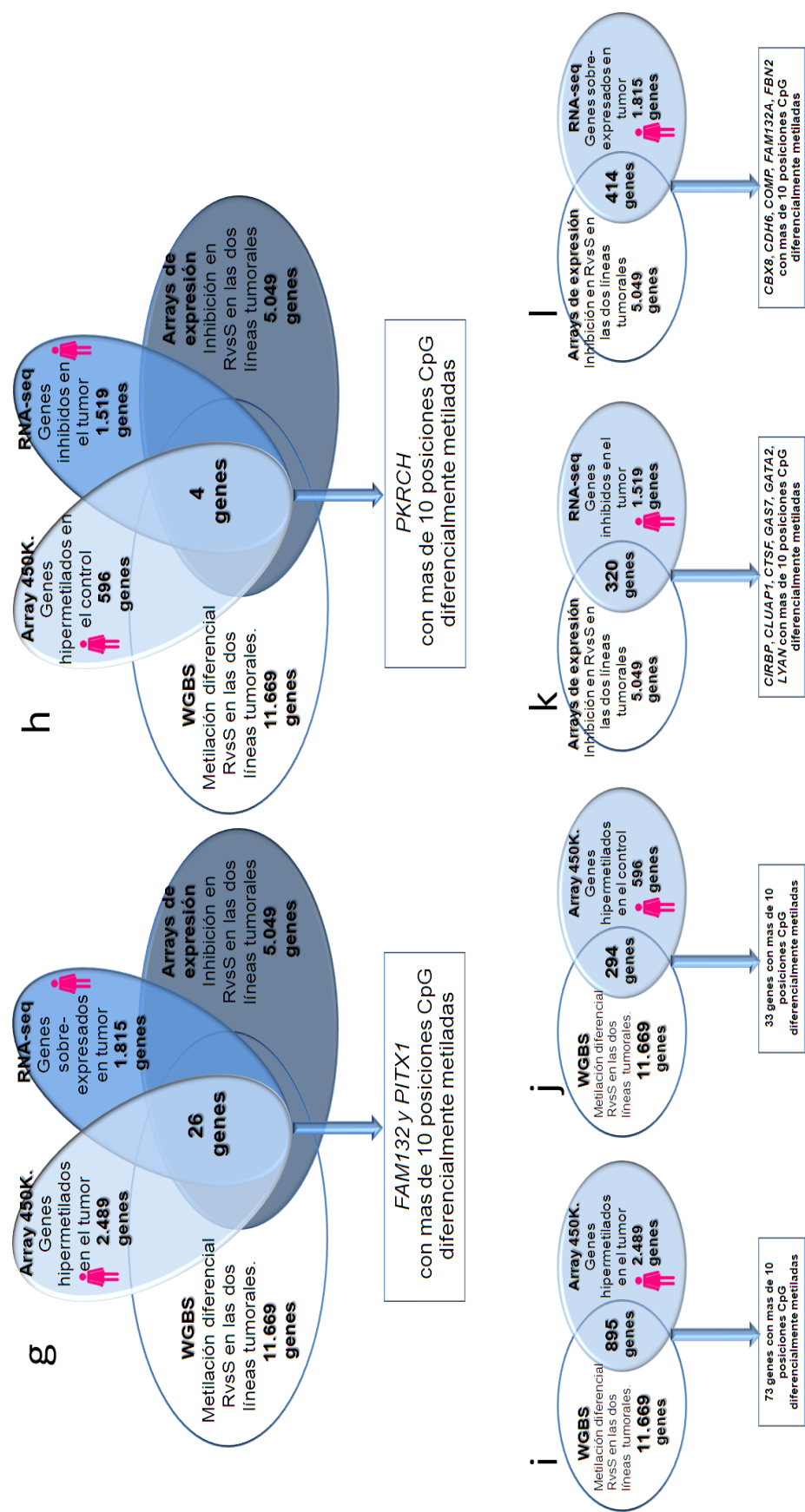


Figura 2. Contrastes del grupo 3. Los diagramas a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k y l muestran los resultados de los análisis desarrollados entre los datos obtenidos de los arrays de metilación 450K teniendo en cuenta los genes hipermetilados en los tumores y en el control, los datos de transcriptoma obtenidos por RNA-seq considerando los genes inhibidos y sobre-expresados en el tumor, más los datos de expresión y metilación del modelo experimental.

ANEXO 1

<i>ABR</i>	<i>DMRTA2</i>	<i>GFRA3</i>	<i>MBP</i>	<i>PITX1</i>	<i>SHC3</i>	<i>WNT11</i>
<i>ANO9</i>	<i>ECE1</i>	<i>GRIK3</i>	<i>MKNK2</i>	<i>PIWIL1</i>	<i>SLC9A3R2</i>	<i>WNT5B</i>
<i>APBB2</i>	<i>ECEL1P2</i>	<i>HEBP1</i>	<i>MMP14</i>	<i>PKN1</i>	<i>STOX2</i>	<i>ZBTB46</i>
<i>APCDD1L</i>	<i>ELANE</i>	<i>IGFBP3</i>	<i>MXRA8</i>	<i>PLXNC1</i>	<i>TAL1</i>	<i>ZFPM2</i>
<i>ARL10</i>	<i>ESPN</i>	<i>IRF5</i>	<i>NDRG4</i>	<i>PRR5L</i>	<i>TBX1</i>	<i>ZIC4</i>
<i>ATP10A</i>	<i>FAM132A</i>	<i>IRX1</i>	<i>NKX6-2</i>	<i>PTPN21</i>	<i>TBX3</i>	<i>ZMIZ1</i>
<i>B3GNT6</i>	<i>FBLN2</i>	<i>LHX3</i>	<i>NRXN2</i>	<i>PVT1</i>	<i>TNFRSF8</i>	<i>ZNF490</i>
<i>BTBD19</i>	<i>FOXE1</i>	<i>LMF1</i>	<i>PAX2</i>	<i>RBP1</i>	<i>TP73</i>	
<i>CACNA1B</i>	<i>FOXP1</i>	<i>LSP1</i>	<i>PDE8B</i>	<i>RGL3</i>	<i>TPM1</i>	
<i>CLUAP1</i>	<i>GABRA5</i>	<i>LTBP2</i>	<i>PDE9A</i>	<i>RUFY1</i>	<i>TRPV4</i>	
<i>DEGS2</i>	<i>GATM</i>	<i>MACROD1</i>	<i>PIGL</i>	<i>SEMA6D</i>	<i>TLL10</i>	

Tabla 4. Genes resultantes del contraste i con más de 10 posiciones diferencialmente CpG metiladas.

<i>AMN</i>	<i>GDNF</i>	<i>MEST</i>
<i>BRSK2</i>	<i>GPR123</i>	<i>MLPH</i>
<i>C20orf85</i>	<i>GPR133</i>	<i>PHACTR3</i>
<i>CA10</i>	<i>HMHA1</i>	<i>PRDM16</i>
<i>CACNA1H</i>	<i>IGDCC4</i>	<i>PTP4A2</i>
<i>CAPN1</i>	<i>IKZF1</i>	<i>PTPRE</i>
<i>EMX2OS</i>	<i>KCNN1</i>	<i>PTPRN2</i>
<i>FAM19A2</i>	<i>KCNQ1</i>	<i>RPP25</i>
<i>GABRB3</i>	<i>KIF26A</i>	<i>SARM1</i>
<i>GALNT9</i>	<i>KNDC1</i>	<i>SERTAD4</i>
<i>TMEM132D</i>	<i>VDR</i>	<i>VWA5B2</i>

Tabla 5. Genes resultantes del contraste j con más de 10 posiciones diferencialmente CpG metiladas

TABLA 6. Características clínico-histo-patológicas de 81 pacientes con cáncer de ovario pertenecientes al hospital del mar.

Número de muestra	Escala ECOG	Desarrollo de Ascites	Histología	Grado	Enfermedad Residual	Quimioterapia	Recurrencia	Sensibilidad a platino	Supervivencia Libre de Enfermedad (meses)	Estado	Supervivencia Global (meses)	FKBP1B (MSP)	PAX9 (MSP)
33	1	No	Otros	Bien diferenciado	No hay datos	Cisplatino+Ciclofosfamida	No	No hay datos		Vivo	156	Metilado	No metilado
34	2	Sí	Células Claras	Moderadamente diferenciado	Sí	No hay datos	No	No hay datos		Vivo	11	Metilado	No determinado
38	3	Sí	Seroso	Moderadamente diferenciado	No hay datos	No hay datos	No	No hay datos		Fallecido	0	No metilado	No metilado
39	0	No	Otros	Bien diferenciado	Sí	Otro	No	No hay datos		Vivo	131	No metilado	No metilado
40	2	Sí	Mucinoso	Moderadamente diferenciado	Sí	Otro	Sí	Sensible	32	Fallecido	192	No metilado	No metilado
41	1	No	Seroso	Bien diferenciado	Sí	Otro	No	No hay datos		Vivo	131	No determinado	No metilado
42	0	No	Otros	Bien diferenciado	No	No hay datos	No	No hay datos		Vivo	0	No metilado	No determinado
43	1	No	Células Claras	Moderadamente diferenciado	No	Carboplatino+Ciclofosfamida	No	No hay datos		Vivo	8	No metilado	No metilado
44	1	Sí	Mucinoso	Bien diferenciado	Sí	No hay datos	No	No hay datos		Fallecido	16	No metilado	No metilado
46	0	No	Seroso	Bien diferenciado	No	No hay datos	No	No hay datos		Vivo	15	No metilado	No metilado
47	1	No	Otros	Bien diferenciado	No	Cisplatino+Ciclofosfamida	No	No hay datos		Vivo	109	Metilado	No metilado
48	0	No	Seroso	Bien diferenciado	No	Cisplatino+Ciclofosfamida	No	No hay datos		Vivo	39	Metilado	No metilado
49	0	No	Células Claras	Moderadamente diferenciado	No	Cisplatino+Ciclofosfamida	Sí	Sensible	39	Fallecido	83	Metilado	No metilado
50	1	No	Endometrioide	Moderadamente diferenciado	No	Cisplatino+Ciclofosfamida	No	No hay datos		Vivo	76	No metilado	No metilado
51	1	No	Otros	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Resistente	2	Fallecido	12	No metilado	No metilado
52	1	No	Seroso	Moderadamente diferenciado	No hay datos	Cisplatino+Ciclofosfamida	No	No hay datos		Vivo	94	Metilado	No metilado
53	1	Sí	Células Claras	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Sensible	7	Fallecido	25	Metilado	No metilado
54	0	No	Otros	Bien diferenciado	No	No hay datos	No	No hay datos		Vivo	48	Metilado	No metilado
55	2	Sí	Seroso	Bien diferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	No	No hay datos		Vivo	41	No metilado	No metilado
56	2	Sí	Seroso	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Resistente	0	Fallecido	5	No metilado	No metilado
57	2	Sí	Seroso	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Sensible		Fallecido	59	No determinado	No metilado
58	1	Sí	Seroso	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Resistente	4	Fallecido	13	Metilado	No metilado
59	2	Sí	Seroso	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Sensible	18	Fallecido	68	No metilado	No metilado
60	2	No	Seroso	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Sensible	39	Vivo	67	No metilado	No metilado

Continuación Tabla 6

61	2	Sí	Mucinoso	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Sensible	15	Fallecido	32	Metilado	No metilado
62	2	Sí	Mucinoso	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	No hay datos		Fallecido	52	No determinado	No metilado
63	1	Sí	Otros	Bien diferenciado	No	No hay datos	No	No hay datos		Vivo	60	Metilado	No metilado
64	1	No	Endometrioide	Moderadamente diferenciado	No	Otro	No	Sensible	11	Vivo	52	No metilado	No metilado
65	1	Sí	Endometrioide	Bien diferenciado	No	Carboplatino+Taxol	No	No hay datos		Vivo	44	No metilado	No metilado
66	3	Sí	Seroso	Moderadamente diferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Resistente	4	Fallecido	17	No metilado	No metilado
67	3	No	Seroso	Indiferenciado	No	Carboplatino+Taxol	Sí	Resistente	3	Fallecido	10	Metilado	No metilado
68	1	No	Células Claras	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Resistente	3	Fallecido	29	Metilado	No metilado
69	2	No	Seroso	Indiferenciado	No	Carboplatino+Taxol	Sí	Sensible	19	Fallecido	34	Metilado	No metilado
70	1	No	Seroso	Indiferenciado	No	Cisplatino+Ciclofosfamida	No	No hay datos		Vivo	38	Metilado	No metilado
71	1	No	Otros	Moderadamente diferenciado	No	Carboplatino+Taxol	No	No hay datos		Vivo	28	Metilado	No metilado
72	1	No	Otros	Moderadamente diferenciado	Sí	No hay datos	No	No hay datos		Vivo	35	No determinado	No metilado
73	1	No	Seroso	Indiferenciado	No	Carboplatino+Taxol	No	No hay datos		Vivo	27	Metilado	No metilado
74	0	No	Otros	Moderadamente diferenciado	No	No hay datos	No	No hay datos		Vivo	25	Metilado	No metilado
75	1	No	Seroso	Moderadamente diferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Resistente	2	Fallecido	12	No metilado	No metilado
76	2	Sí	Seroso	Indiferenciado	Sí	Cisplatino+Ciclofosfamida	Sí	Resistente	4	Fallecido	15	No metilado	No metilado
77	2	No	Mucinoso	Bien diferenciado	No	Cisplatino+Ciclofosfamida	No	No hay datos		Vivo	25	Metilado	No metilado
78	1	Sí	Seroso	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	No	No hay datos		Vivo	26	Metilado	No metilado
79	1	Sí	Seroso	Bien diferenciado	No	Cisplatino+Ciclofosfamida	No	No hay datos		Vivo	17	Metilado	No metilado
80	2	No	Seroso	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Sensible	6	Vivo	23	Metilado	Metilado
81	1	No	Seroso	Moderadamente diferenciado	No	Carboplatino+Taxol	No	No hay datos		Vivo	23	Metilado	Metilado
82	2	Sí	Seroso	Moderadamente diferenciado	No	Carboplatino+Taxol	Sí	Sensible	10	Fallecido	21	Metilado	Metilado
140	2	Sí	Seroso	Indiferenciado	Sí	Intraperitoneal	Sí	Sensible	12	Fallecido	21	Metilado	Metilado
141	1	No	Seroso	Bien diferenciado	No	Cisplatino+Ciclofosfamida	No	No hay datos		Vivo	88	Metilado	Metilado
142	3	No	Seroso	Bien diferenciado	Sí	Cisplatino+Ciclofosfamida	No	No hay datos		Fallecido	125	Metilado	Metilado
143	1	No	Seroso	Moderadamente diferenciado	No	Cisplatino+Ciclofosfamida	No	No hay datos		Vivo	105	Metilado	Metilado
144	2	Sí	Células Claras	Indiferenciado	Sí	No hay datos	No	No hay datos		Fallecido	1	Metilado	Metilado
145	0	No	Otros	Bien diferenciado	No	No hay datos	No	No hay datos		Vivo	5	Metilado	Metilado

Continuación Tabla 6

147	1	Sí	Otros	Bien diferenciado	No	No hay datos	No	No	No hay datos		Vivo		Metilado	No metilado
148	0	Sí	Seroso	Bien diferenciado	No	Cisplatino+Ciclofosfamida	No	No	No hay datos		Vivo	121	Metilado	No metilado
149	0	No	Seroso	Bien diferenciado	No	Cisplatino+Ciclofosfamida	No	Sí	Sensible	38	Fallecido	98	No metilado	No metilado
150	1	No	Otros	Moderadamente diferenciado	No	Otro	No	No	No hay datos		Vivo		Metilado	No metilado
151	1	No	Mucinoso	Bien diferenciado	No	Cisplatino+Ciclofosfamida	No	No	No hay datos		Vivo	110	No determinado	No metilado
152	0	No	Otros	Bien diferenciado	No	No hay datos	No	No	No hay datos		Vivo	58	Metilado	Metilado
153	0	No	Mucinoso	Bien diferenciado	No	Cisplatino+Ciclofosfamida	No	No	No hay datos		Vivo	98	No metilado	Metilado
155	1	No	Otros	Bien diferenciado	No	No hay datos	No	No	No hay datos		Vivo	57	No metilado	Metilado
156	0	No	Otros	Bien diferenciado	No	No hay datos	No	No	No hay datos		Vivo	89	No metilado	No metilado
157	0	No	Otros	Bien diferenciado	No	No hay datos	No	No	No hay datos		Vivo	79	No metilado	No metilado
158	2	Sí	Seroso	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Sí	Sensible	11	Fallecido	36	No metilado	No metilado
159	3	Sí	Otros	Indiferenciado	No hay datos	Carboplatino+Taxol	No	Sí	Sensible	9	Fallecido	18	No metilado	No metilado
160	1	No	Otros	Bien diferenciado	No	No hay datos	No	No	No hay datos		Vivo	65	No metilado	No metilado
161	1	No	Seroso	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Sí	Sensible	20	Fallecido	44	No metilado	No metilado
162	2	Sí	Seroso	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Sí	Sensible	7	Fallecido	24	No determinado	No metilado
163	1	No	Seroso	Moderadamente diferenciado	No	Carboplatino+Taxol	No	Sí	Sensible	19	Fallecido	35	No metilado	No metilado
164	1	No	Mucinoso	Bien diferenciado	No	No hay datos	No	Sí	Sensible	9	Fallecido	18	Metilado	No metilado
165	2	Sí	Mucinoso	Moderadamente diferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Sí	Resistente	1	Fallecido	4	No metilado	No metilado
166	0	Sí	Otros	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	No	No hay datos		Vivo	41	Metilado	No metilado
167	0	No	Células Claras	Moderadamente diferenciado	No	Carboplatino+Taxol	No	No	No hay datos		Vivo	40	Metilado	No metilado
168	2	No	Seroso	Indiferenciado	No	Carboplatino+Taxol	No	Sí	Sensible	13	Vivo	42	No metilado	No metilado
169	2	Sí	Seroso	Indiferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Sí	Resistente	2	Fallecido	30	Metilado	No metilado
170	0	Sí	Seroso	Bien diferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	No	No hay datos		Vivo	34	No determinado	No metilado
171	1	Sí	Otros	Bien diferenciado	No	No hay datos	No	No	No hay datos		Vivo	27	No metilado	No metilado
172	0	No	Seroso	Moderadamente diferenciado	No	Carboplatino+Taxol	No	No	No hay datos		Vivo	30	No metilado	No metilado
173	1	Sí	Seroso	Moderadamente diferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	Sí	Sensible	9	Fallecido	26	No metilado	No metilado
174	0	Sí	Células Claras	Bien diferenciado	No	Carboplatino+Taxol	No	Sí	Sensible	12	Vivo	20	Metilado	No metilado
175	0	No	Seroso	Bien diferenciado	No	Cisplatino+Ciclofosfamida	No	No	No hay datos		Vivo	20	Metilado	No metilado
176	0	No	Otros	Bien diferenciado	Sí	Carboplatino+Taxol	Sí	No	No hay datos		Vivo	3	No metilado	No metilado

TABLA 7. Características clínico-histo-patológicas de 56 pacientes con cáncer de ovario pertenecientes al Biobanco CHUS

Número de muestra	Origen	Histología	Grado	Quimioterapia	Recidiva	Sensibilidad a platino	Supervivencia Libre de enfermedad (meses)	Estado	Supervivencia Global (meses)	Expresión FKBP1B (2-ΔΔCt)	Metilación FKBP1B (%)	FKBP1B (MSP)	Expresión PAX9 (2-ΔΔCt)	Metilación PAX9 (%)	PAX9 (MSP)
333	Carcinoma	Seroso	Grado 2	Platino + Taxano	No hay datos	Sensible		Vivo	27	0,3	5,9	No metilado	0,1	11,4	No metilado
334	Cistoadenocarcinoma	Seroso	Grado 0	No aplica	No hay datos	Resistente		Fallecido	23	1,9	1,9	No metilado	0,1	0,8	No metilado
336	Carcinoma	Seroso	No hay datos	No aplica	No hay datos	No hay datos		Fallecido	1	0,1	5,1	No metilado	26,5	0,8	No metilado
337	Carcinoma	Seroso	Grado 1	Platino + Taxano	No hay datos	Sensible		Vivo	53	0,2	3,0	No metilado	6,2	3,0	Metilado
338	Adenocarcinoma	Endometroide	Grado 0	No aplica	No hay datos	No hay datos		Vivo	57	0,4	1,8	No metilado	55,4	0,9	No metilado
339	Adenocarcinoma	Seroso	Grado 2	Platino + Taxano	No hay datos	No hay datos		Vivo	36	1,1	5,7	No metilado	1,8	3,4	No metilado
340	Carcinoma	Seroso	Grado 3	Platino + Taxano	No hay datos	Resistente		Fallecido	17	0,2	7,8	No metilado	0,2	0,1	Metilado
341	Carcinoma	Células Claras	Grado 1	Platino + Taxano	No hay datos	Refractario		Fallecido	37	0,2	2,6	No metilado	0,2	3,1	No metilado
342	Cistoadenocarcinoma	Seroso	Grado 2	Platino + Taxano	No hay datos	Resistente		Fallecido	24	0,2	0,7	No metilado	1,1	12,0	No metilado
562	Adenocarcinoma	Seroso	Grado 3	Platino + Taxano	Sí	Refractario	4	Fallecido	173	0,3	0,1	No metilado	0,0	1,3	No metilado
563	Carcinoma	Seroso	Grado 1	Platino + Taxano	Sí	Refractario	19	Fallecido	82	3,2	0,9	No metilado	8,8	5,6	No metilado
564	Carcinoma	Seroso	Grado 2	Platino	No	Sensible	19	Fallecido	61	0,6	1,8	No metilado	4,5	35,8	Metilado
565	Cistoadenocarcinoma	Mucinoso	Grado 3	Platino + Taxano	Sí	Refractario	0	Fallecido	9	0,0	20,7	No metilado	0,0	0,3	No metilado
566	Adenocarcinoma	Células Claras	Grado 2	Platino + Taxano	No	Refractario	4	Vivo	5	0,2	0,6	No metilado	22,5	0,0	No metilado
567	Adenocarcinoma	Seroso	Grado 1	Platino + Taxano	Sí	Refractario	1	Fallecido	23	0,6	0,5	No metilado	0,3	38,4	Metilado
568	Adenocarcinoma	Células Claras	Grado 1	Platino + Taxano	No	Refractario	3	Vivo	4	0,6	8,8	No metilado	0,3	15,7	No metilado
569	Adenocarcinoma	Células Claras	Grado 1	Otro	Sí	Refractario	3	Fallecido	8	2,7	0,3	No metilado	54,1	50,7	Metilado
570	Cistoadenocarcinoma	Seroso	Grado 3	Platino + Taxano	Sí	Resistente	13	Fallecido	14			No determinado			No determinado
571	Adenocarcinoma	Seroso	Grado 3	Platino + Taxano	No	Refractario	4	Vivo	6			No determinado			No determinado
572	Cistoadenocarcinoma	Seroso	Grado 3	Platino + Taxano	Sí	Resistente	15	Fallecido	36			No determinado			No determinado
573	Adenocarcinoma	Seroso	Grado 3	Platino + Taxano	Sí	Refractario	0	Fallecido	31	0,9	3,1	No metilado	3,9	1,0	No metilado
574	Adenocarcinoma	Endometroide	Grado 3	Platino + Taxano	Sí	Resistente	4	Fallecido	18			No determinado			No determinado

Continuación Tabla 7

575	Carcinoma	Seroso	Grado 3	Platino + Taxano	Sí	No hay datos	0	Fallecido	42	0,8	0,2	No metilado	32,0	0,3	No metilado
576	Adenocarcinoma	Seroso	Grado 1	Platino + Taxano	No	Refractario	3	Vivo	4	0,4	0,2	Metilado	0,8	0,4	No metilado
577	Adenocarcinoma	Células Claras	Grado 2	Platino + Taxano	No	Refractario	4	Vivo	6	2,3	12,4	Metilado	0,5	4,5	No metilado
578	Adenocarcinoma	Células Claras	Grado 1	Platino + Taxano	Sí	Sensible	54	Vivo	14	3,7	0,6	No metilado	95,2	2,0	No metilado
579	Carcinoma	Seroso	Grado 3	Platino + Taxano	Sí	Refractario	9	Fallecido	7	1,8	3,9	Metilado	3,1	12,0	No metilado
580	Carcinoma	Indiferenciado	Grado 3	Platino + Taxano	Sí	Resistente	9	Fallecido	18			No determinado			No determinado
581	Adenocarcinoma	Endometroide	Grado 1	Platino + Taxano	No	Refractario	3	Vivo	6	0,2	1,4	No metilado	3,0	0,7	No metilado
582	Carcinoma	Células Claras	Grado 3	Platino + Taxano	No	Refractario	2	Vivo	4	0,6	22,1	Metilado	6,0	4,7	No metilado
583	Cistoadenocarcinoma	Seroso	Grado 3	Platino + Taxano	No	Refractario	3	Vivo	4	0,5		No determinado			No determinado
584	Adenocarcinoma	Mucinoso	Grado 1	Platino	Sí	Refractario	4	Fallecido	3	2,6	1,1	No metilado	0,2	68,6	Metilado
585	Cistoadenocarcinoma	Seroso	Grado 3	Platino + Taxano	Sí	Refractario	0	Fallecido	17	1,3	0,9	No metilado	0,0	2,0	No metilado
685	Carcinoma	Seroso	Grado 0	Platino + CTX	Sí	No hay datos	48	Vivo	265	0,4	1,4	No metilado	0,1	4,7	No metilado
686	Cistoadenocarcinoma	Seroso	Grado 3	Platino + CTX	Sí	Refractario	0	Vivo	8	0,1	1,3	No metilado	0,0	0,4	No metilado
687	Cistoadenocarcinoma	Células Claras	Grado 3	Platino + CTX	Sí	No hay datos	20	Vivo	25	0,4	13,2	No metilado	0,8	0,3	No metilado
688	Carcinoma	Indiferenciado	Grado 3	Otro	Sí	No hay datos	22	Fallecido	33	0,3	1,1	No metilado			No determinado
689	Carcinoma	Endometroide	Grado 3	Platino + CTX	No	Sensible	247	Vivo	248	0,2	35,0	No metilado	0,1	1,8	No metilado
690	Adenocarcinoma	Células Claras	Grado 1	Platino + CTX	Sí	Sensible	25	Vivo	281	0,1	0,2	No metilado	0,3	6,6	No metilado
691	Adenocarcinoma	Endometroide	Grado 3	Platino + CTX	No	Sensible	82	Fallecido	82	0,6	0,8	No metilado	16,5	0,1	No metilado
693	Carcinoma	Células Claras	Grado 2	Platino + CTX	No	Sensible	2	Fallecido	2	1,0	0,1	No metilado	46,5	29,7	Metilado
694	Carcinoma	Mucinoso	Grado 3	No aplica	No	Sensible	122	Fallecido	122	0,6	7,2	No metilado	0,9	2,5	No metilado
695	Carcinoma	Seroso	Grado 2	Platino + CTX	No	Sensible	237	Vivo	237	2,1	0,3	No metilado	2,4	44,5	Metilado
696	Cistoadenocarcinoma	Seroso	Grado 3	Platino + Taxano	Sí	Sensible	16	Fallecido	38	0,3	2,5	No metilado	0,5	0,1	No metilado
697	Cistoadenocarcinoma	Endometroide	Grado 1	Platino + Taxano	No	Sensible	211	Vivo	211	2,9	1,1	No metilado			No determinado
698	Carcinoma	Seroso	Grado 3	Platino + Taxano	Sí	Sensible	23	Fallecido	87	0,6	2,4	No metilado	36,4	0,2	No metilado

ANEXO 1

TABLA 8. Características clínico-histo-patológicas de 39 pacientes con cáncer de ovario pertenecientes al Biobanco HULP-CNIO

Número de muestra	Tipo	Estadio	Supervivencia Libre de Enfermedad (meses)	Recidiva	Supervivencia Global	Estado	FKBP1B (MSP)	PAX9 (MSP)
523	Familiar	IV		Sí	32	Fallecido	No metilado	Metilado
524	Familiar	III		Sí	25	Fallecido	Metilado	No metilado
525	Familiar	III	13	No	60	Vivo	No metilado	No metilado
526	Familiar	III		Sí	14	Fallecido	No metilado	No metilado
527	Familiar	III	16	Sí	77	Fallecido	No metilado	No metilado
528	Familiar	III	15	No	33	Vivo	No metilado	No metilado
529	Familiar	No hay datos	20	No	72	Vivo	No metilado	No metilado
530	Familiar	II		No	72	Vivo	No metilado	No metilado
531	Familiar	III	23,1	No	23,13	Vivo	No metilado	Metilado
532	Familiar	III	13,4	Sí	73,2	Fallecido	No metilado	No metilado
533	Esporádico	III	20	Sí	82	Fallecido	No metilado	No metilado
534	Esporádico	III	14	Sí	15	Fallecido	No metilado	No metilado
535	Esporádico	I	1	No	1	Fallecido	No metilado	No metilado
536	Esporádico	No hay datos	21	No	11	Fallecido	No metilado	No metilado
537	Esporádico	III	15	Sí	61	Fallecido	No metilado	No metilado
538	Esporádico	III	6	Sí	43	Fallecido	No determinado	No metilado
539	Esporádico	III	5	Sí	9	Fallecido	No determinado	No metilado
540	Esporádico	III	2	Sí	3	Vivo	No determinado	No metilado
541	Esporádico	II	37	Sí	79	Vivo	No metilado	No metilado
542	Esporádico	I		No	67	Vivo	No metilado	No metilado
543	Esporádico	III	5	Sí	6	Fallecido	No metilado	No metilado
544	Esporádico	III	37	Sí	61	Vivo	No metilado	No metilado
545	Esporádico	III		No	67	Vivo	No metilado	No metilado
546	Esporádico	IV	9	Sí	29	Fallecido	No metilado	No metilado
547	Esporádico	III	41	Sí		Vivo	No metilado	No metilado
548	Esporádico	III	3	Sí	5	Vivo	Metilado	No metilado
549	Esporádico	III	20	Sí	40	Vivo	Metilado	No metilado
550	Esporádico	III	14	Sí	58	Vivo	No metilado	No metilado
551	Esporádico	III	16	Sí	22	Fallecido	No metilado	No metilado
552	Esporádico	II		No	47	Vivo	No metilado	No metilado
553	Esporádico	I	42	Sí	44	Vivo	No metilado	No metilado
554	Esporádico	No hay datos	16	Sí	22	Fallecido	No metilado	No metilado
555	Esporádico	III	11	Sí	16	Fallecido	No metilado	No metilado
556	Esporádico	I		Sí	33	Vivo	No metilado	No metilado
557	Esporádico	III		No	1	Vivo	No metilado	No metilado
558	Esporádico	III	40	Sí	18	Vivo	No metilado	No metilado
559	Esporádico	No hay datos		No	27	Vivo	No metilado	No metilado
560	Esporádico	II	11	Sí	27	Vivo	No determinado	No metilado
561	Esporádico	IV		No	1	Vivo	No determinado	No metilado

ANEXO 1

TABLA 9. Características clínico-histo-patológicas de 8 pacientes con cáncer de ovario pertenecientes al Centro Oncológico Clara Campal.

Número de muestra	Histología	Estadio	Quimioterapia	Sensibilidad a platino	Recidiva	Supervivencia Libre de Enfermedad (meses)	Supervivencia Global (meses)	Estado	FKBP1B (MSP)	PAX9 (MSP)
407	Adenocarcinoma	IIIc	Carboplatino+ Taxol	Resistente	Sí	6	39	Fallecido	No metilado	No metilado
408	Adenocarcinoma	IV	Carboplatino+ Taxol	Resistente	Sí	5	31	Fallecido	No metilado	No metilado
411	Adenocarcinoma	IIIc	Carboplatino+ Taxol	Resistente	Sí	6	39	Fallecido	No metilado	No metilado
412	Adenocarcinoma	IV	Carboplatino+ Taxol	Resistente	Sí	2	21	Fallecido	No metilado	No metilado
413	Adenocarcinoma	IIIc	Carboplatino+ Taxol	Resistente	Sí	4	18	Fallecido	No metilado	No metilado
414	Adenocarcinoma	IV	Carboplatino+ Taxol	Resistente	Sí	4	15	Fallecido	No metilado	No metilado
409	Adenocarcinoma	IV	Carboplatino+ Taxol	Refractario	Sí	1	5	Fallecido	No metilado	No metilado
410	Adenocarcinoma	IV	Carboplatino+ Taxol	Refractario	Sí	0	7	Fallecido	No metilado	No metilado